OPEN BIO

LIFESCIENCE EVENT

СБОРНИК ТЕЗИСОВ

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

В РАМКАХ ПЛОЩАДКИ ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО, 2024

Вектор

ИЦК ИННОВАЦИОННЫЙ ЦЕНТР КОЛЬЦОВО

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО

БИОТЕХНОПАРК КОЛЬЦОВО

БИОФАРМ

Новосибирский областной инновационный фонд

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

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2024

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

М431 XI Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов, молекулярных биологов и специалистов фундаментальной медицины — 2024 : сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2024. — 780 с.

ISBN 978-5-4437-1691-6

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-2024.

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

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

ISBN 978-5-4437-1691-6
DOI 10.25205/978-5-4437-1691-6

© АНО «Инновационный центр Кольцово», 2024

РАЗДЕЛ I

БИОИНФОРМАТИКА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-1

IDENTIFICATION OF POTENTIAL MASTER REGULATOR MOLECULES RESPONSIBLE FOR NON-TOLERANT REACTION IN CHRONIC INFLAMMATORY DISEASE *

D. D. Borodko, E. M. Pleshko, T. Kirichenko, V. N. Sukhorukov, A. V. Omelchenko

Laboratory of Molecular Genetic Modeling of Inflammaging,
Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

✉ daria.borodko@gmail.com

Abstract

Chronic inflammatory diseases like atherosclerosis and CVD significantly impact global health by causing immune-mediated organ damage. This study aims to identify potential biomarkers of immune cell populations driving chronic inflammation. We performed transcriptomic analysis of 82 samples and identified OSMR and TREM2 as key downregulated genes, suggesting their potential as searched biomarkers.

Motivation and Aim

Chronic inflammatory diseases, including atherosclerosis, cardiovascular disease (CVD), rheumatoid arthritis, and inflammatory bowel disease, significantly impact global health. These diseases arise when the immune system shows inadequate response to endogenous stimuli, leading to organ damage and dysfunction. Despite extensive research on the molecular and cellular mechanisms of chronic inflammation, identifying immune cell populations that initiate and drive this process early remains challenging. This study aims to identify biomarkers that can highlight those populations and suggest mechanisms behind the development of chronic inflammation. By discovering these molecules, we hope to gain insights into the signaling pathways and cellular processes involved, laying the foundation for early diagnostics and precision medicine for patients with chronic inflammatory diseases.

Methods and Algorithms

We fused ρ0 THP-1 cells with thrombocytes of atherosclerotic patients, then stimulated resulting cybrids with LPS and measured IL1b, IL6, IL8, and CCL2 levels. We also performed RNA sequencing of 82 RNA samples before stimulation using Illumina MiSeq. Reads were mapped to the human GRCh38 assembly (Ensembl) using STAR. The count matrix was generated within the STAR protocol, followed by differential expression analysis with DESeq2 v1.44.0 ($-0.6 < \log2FC < 0.6$ and p-value < 0.05).

Results

We conducted experiments on 13 monocyte cybrid lines and a control THP-1 line to measure cytokine secretion levels (IL1B, IL6, IL8, and CCL2) before and after LPS stimulation. Cybrid lines were classified into three groups based on their immune response for each cytokine (tolerant, non-tolerant, and non-responder). IL6 and IL1B secretion patterns were similar, resulting in equivalent subsequent analysis outcomes for these groups. RNA sequencing was performed on untreated samples, and DESeq2 was used for differential expression analysis for each cytokine group, considering genes as significantly differentially expressed with $|\log2FoldChange| > 0.6$ and p-value < 0.05 (see Table).

* The study is supported by RSF (project #24-15-00217).

© D. D. Borodko, E. M. Pleshko, T. Kirichenko, V. N. Sukhorukov, A. V. Omelchenko, 2024

DGE with grouping by cytokines (non-tolerant vs tolerant)

Cytokine group	Upregulated	Downregulated
IL6 | IL1b	184	512
IL8	6	61
CCL2	18	379

Our analysis identified OSMR and TREM2 as downregulated in the IL6, IL1B, and CCL2 groups. TREM2 suppresses PI3K and NF-kappa-B signaling in response to lipopolysaccharides, promoting phagocytosis, reducing pro-inflammatory cytokine and nitric oxide production, inhibiting apoptosis, and increasing IL10 and TGFB expression. During oxidative stress, TREM2 enhances anti-apoptotic NF-kappa-B and ERK signaling. Given its good coverage in our analysis, TREM2 is a strong candidate for further investigation as a key regulatory factor in chronic inflammation and a potential biomarker.

OSMR, part of the IL6R receptor family, interacts with STAT family proteins, which are transcription activators, and is upregulated by bacterial lipopolysaccharides (LPS). Although OSMR coverage was limited, suggesting possible false positives, its consistent downregulation indicates the need for further validation. Interestingly, the OSM gene was previously highlighted in our publication as one of the MRs in chronic inflammation [1], and now we have identified differential expression of its receptor, reinforcing its relevance.

Conclusion. In summary, TREM2 and OSMR could serve as biomarkers for identifying specific monocyte populations involved in chronic inflammatory responses. Further validation and exploration of these findings are necessary to fully understand their roles and therapeutic potential.

References

1. Sukhorukov N. V., Khotina V. A., Borodko D. D. et al. Evidence for the involvement of gene regulation of inflammatory molecules in the accumulation of intracellular cholesterol: the mechanism of foam cell formation in atherosclerosis // Current Medicinal Chemistry. 2024. Vol. 31. P. e190224227147.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-2

VALIDATION OF *A. COLUZZII* AND *A. GAMBIAE* HYBRIDS HAPLOTYPE PHASING BY TRIO BINNING

S. D. Dubovskova[1], A. A. Zamyatin[2]

[1] *ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *Pennsylvania State University, USA*

✉ dubovskova.sofya@mail.ru

Abstract

The majority of nowadays genome assemblies are mixed haplotypes. An assembly of such haplotypes introduces DNA variants not present in any of true haplotypes, which negatively affects downstream genome analysis. Therefore, we assembled phased haplotypes of major malaria vectors in Sub-Saharan Africa using trio binning method. To validate haplotype phasing, we performed p-distance and k-mer quotient analyses. The results indicate correct haplotypes phasing.

The majority of nowadays genome assemblies is a mixture of true haplotypes. An assembly of a mixed haplotype introduces DNA variants not present in any of true haplotypes, which negatively affects downstream genome analysis [1]. Therefore, we assembled phased haplotypes of major malaria vectors in Sub-Saharan Africa, *A. coluzzii* and *A. gambiae* [2], using trio binning method [1].

Female and male F_1 offspring of *A. coluzzii* female and *A. gambiae* male were sequenced using Oxford Nanopore Technology [3], and assembled using TrioCanu [1]. As a result, we obtained *A. coluzzii* female and male haplotypes named AcoMOPhfm and AcolMOPhmm respectively, and *A. gambiae* female and male haplotypes named AgamZANUhfp and AgamZANUhmp respectively (unpublished). To validate haplotype phasing, we performed p-distance analysis, and KQ (k-mer quotient).

The p-distance is a proportion of nucleotides in which two sequences differ [4]. To assess haplotypes phasing we calculated p-distance of parental Illumina reads to phased haplotypes. To calculate p-distance we aligned parental Illumina reads on phased haplotypes using BWA-MEM2 [5]. The data from the alignment files was then used to calculate average p-distance per 10 Kb.

P-distance analysis demonstrated that p-distance of parental reads to the same species haplotypes is lower than 0.01 in general, while p-distance of parental reads to different species haplotypes lays between 0.02 and 0.04 in general (Fig. 1–4). This result indicates that parental reads possess higher similarity to the same species haplotypes, therefore, haplotypes are phased correctly.

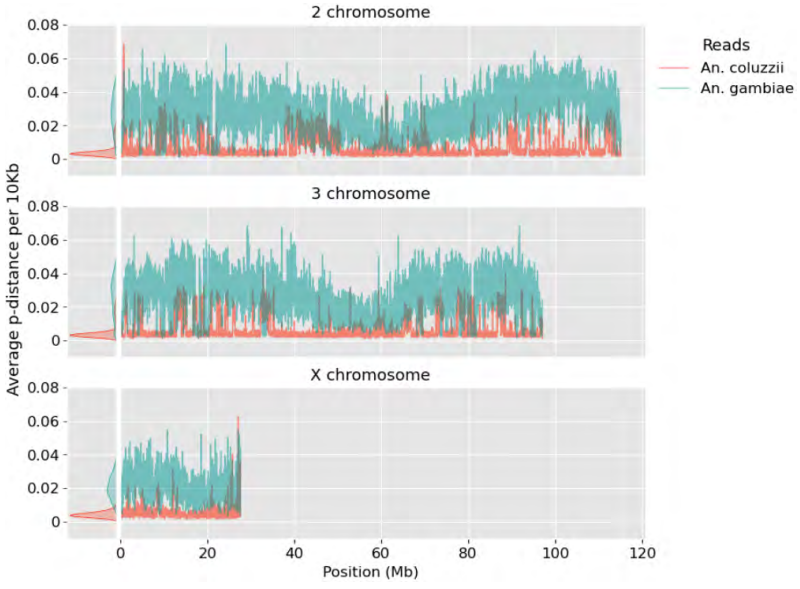


Fig. 1. P-distance of parental reads to *A. coluzzii* AcolMOPhfm haplotype

© S. D. Dubovskova, A. A. Zamyatin, 2024

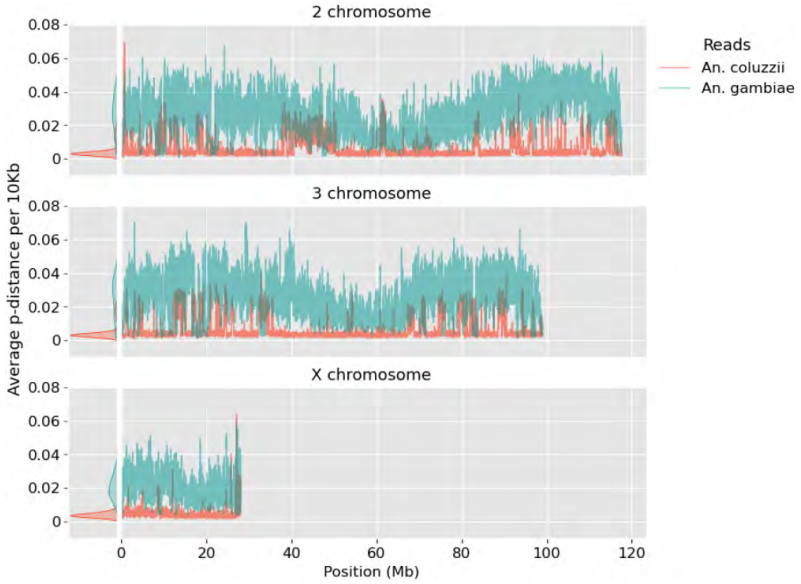


Fig. 2. P-distance of parental reads to *A. coluzzii* AcolMOPhmm haplotype

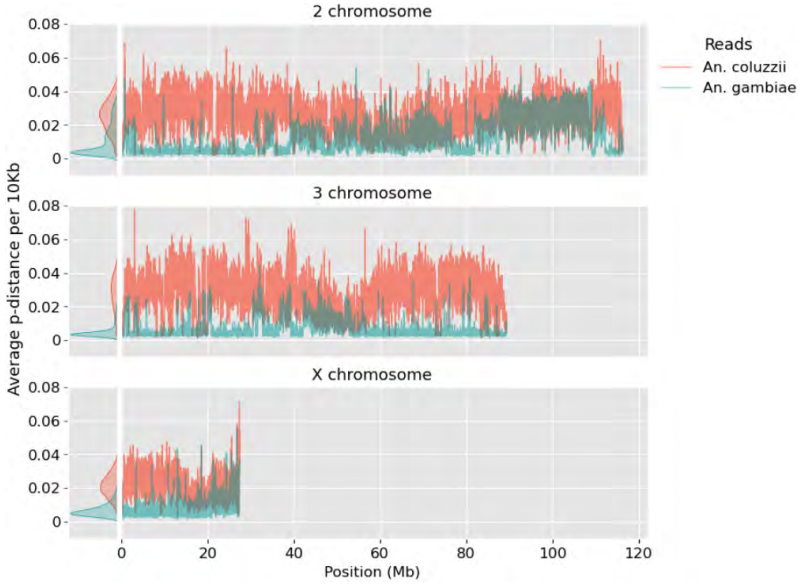


Fig. 3. P-distance of parental reads to *A. gambiae* AgamZANUhfp haplotype

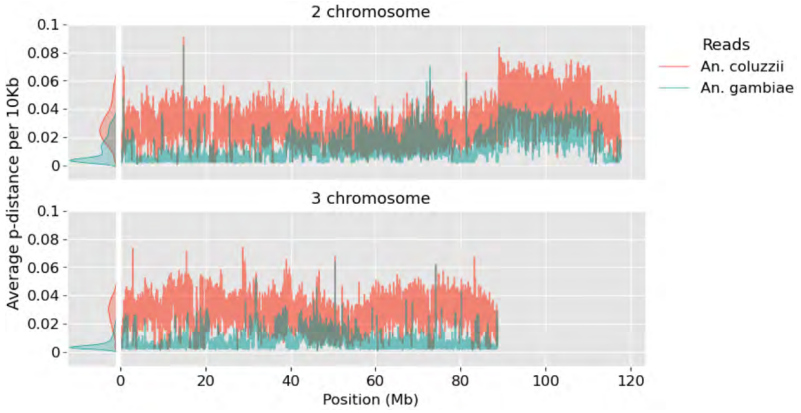


Fig. 4. P-distance of parental reads to *A. gambiae* AgamZANUhmp haplotype

The KQ analysis was initially developed for heterogametic chromosome contigs identification in the genome, and was tested on *B. mori*, females of which have W heterogametic chromosome [6]. In this method W chromosome contigs are identified through number of female-specific k-mers mapped to contigs. According to KQ, k-mer is female-specific if it is not found in male genome, and contig is W chromosome-derived if it has more than 10 female-specific k-mers per 1 Kb mapped to it. But, to validate haplotype phasing, we searched for contigs derived from *A. gambiae* instead of heterogametic chromosome contigs. We extracted k-mers from parental reads using Jellyfish [7] and used them as an input for the script developed by the authors of this method along with phased haplotypes.

KQ analysis identified no *A. gambiae* derived contigs in *A. coluzzii* phased haplotypes AcolMOPhfm and AcolMOPhmm (Fig. 5). On the contrary, this method assigned to *A. gambiae* all chromosome scaffolds and some unscaffolded contigs of *A. gambiae* phased haplotypes AgamZANUhfp and AgamZANUhmp (see Fig. 5). Therefore, KQ validates haplotype phasing.

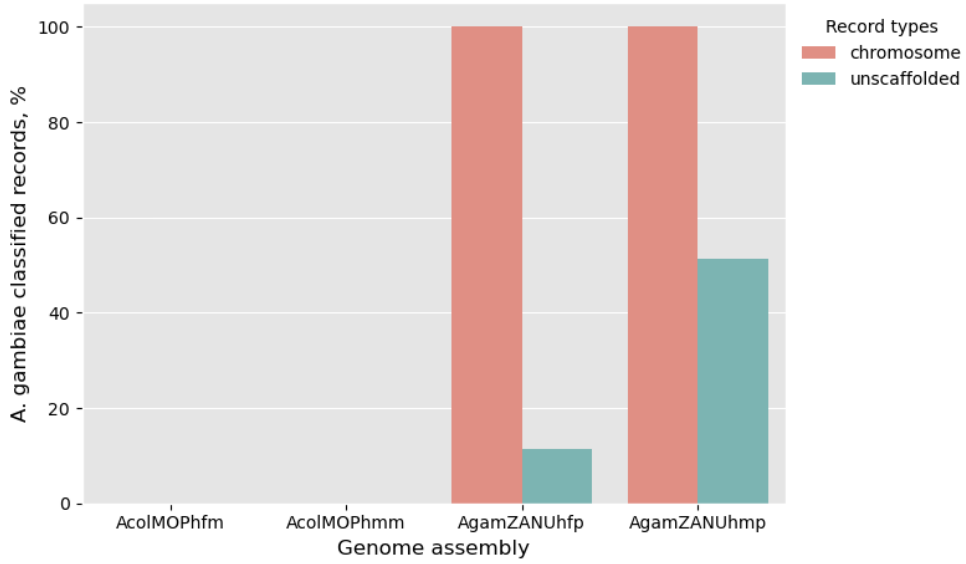


Fig. 5. Genome assembly scaffolds and contigs classified as *A. gambiae* derived

In conclusion, p-distance and KQ analyses validate *A. coluzzii* and *A. gambiae* hybrids haplotype phasing by trio binning.

References

1. Koren S., Rhie A., Walenz B. P. et al. De novo assembly of haplotype-resolved genomes with trio binning // Nat. Biotechnol. 2018. Vol. 36 (12). P. 1174–1182.

2. Zamyatin A., Avdeyev P., Liang J. et al. Chromosome-level genome assemblies of the malaria vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis* // GigaScience. 2021. Vol. 10 (3).

3. Astier Y., Braha O., Bayley H. Toward Single Molecule DNA Sequencing: Direct Identification of Ribonucleoside and Deoxyribonucleoside 5‘-Monophosphates by Using an Engineered Protein Nanopore Equipped with a Molecular Adapter // J. Am. Chem. Soc. 2006. Vol. 128 (5). P. 1705–1710.

4. Bredemeyer K. R., Harris A. J., Li G. et al. Ultracontinuous Single Haplotype Genome Assemblies for the Domestic Cat (*Felis catus*) and Asian Leopard Cat (*Prionailurus bengalensis*) // Journal of Heredity. 2021. Vol. 112 (2). P. 165–173.

5. Vasimuddin Md., Misra S., Li H. et al. Efficient Architecture-Aware Acceleration of BWA-MEM for Multicore Systems. // 2019 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS). Rio de Janeiro, Brazil, 2019. IEEE, 2019. P. 314–324.

6. Li S., Ajimura M., Chen Z. et al. A new approach for comprehensively describing heterogametic sex chromosomes // DNA Research. 2018. Vol. 25 (4). P. 375–382.

7. Marçais G., Kingsford C. A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of *k*-mers // Bioinformatics. 2011. Vol. 27 (6). P. 764–770.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-3

PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF 1,4-DISUBSTITUTED 1*H*-1,2,3-TRIAZOLE DERIVATIVES BY MOLECULAR DOCKING

D. I. Guryev[1], K. M. Verbilo[1], A. V. Zuraev[1,2]

[1]*Belarusian State University, Minsk*
[2]*Research Institute of Physical and Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk*

✉ danilaguryev2003@gmail.com

Abstract

In accordance with rational drug discovery methodologies, the antiproliferative activity of 1,4-disubstituted 1*H*-1,2,3-triazole derivatives was investigated utilizing an in-house prediction algorithm for molecular docking. This prediction algorithm, implemented in existing software to automate routine stages using Python, is designed for universal application, enabling its use with a diverse array of ligands and targets.

Introduction

The development of novel biologically active compounds is currently undergoing significant advancements, both within the scientific community and the pharmaceutical industry, through the application of rational design strategies. Central to this approach is molecular modeling, which aims to minimize the resource and temporal expenditure associated with the discovery of new biologically active compounds.

Beyond molecular modeling, it is prudent to conduct a rigorous filtration of the chemical compound space, prioritizing structures with the highest potential to evolve into viable drug candidates. The paradigm of click chemistry advocates for the initial exploration of compounds that can be synthesized from simple and readily accessible precursors via reactions characterized by high yields and favorable conditions.

Accordingly, the objective of this study is to harness the synthetic capabilities of our research laboratory, grounded in the principles of click chemistry, to perform molecular modeling of chemical compounds for anticancer activity. The aim is to identify and select hit compounds from the resulting data, thereby advancing the discovery of promising therapeutic candidates.

Materials and Method

The objects of this study are: 1) a set of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles (see Figure), which can be synthesized in our research laboratory (acting as ligands), and 2) proteins that are directly or indirectly responsible for the development of cancer, serving as biological targets.

For molecular modeling, we employed the molecular docking method to predict the most favorable conformation and orientation of the ligand molecule within the active site of the macromolecule. The Glide 7.8 program [2–4], along with other utilities from the Schrödinger 2018-1 software package [5], was used for docking. The OPLS 3 force field [6] and the GlideScore scoring function were utilized.

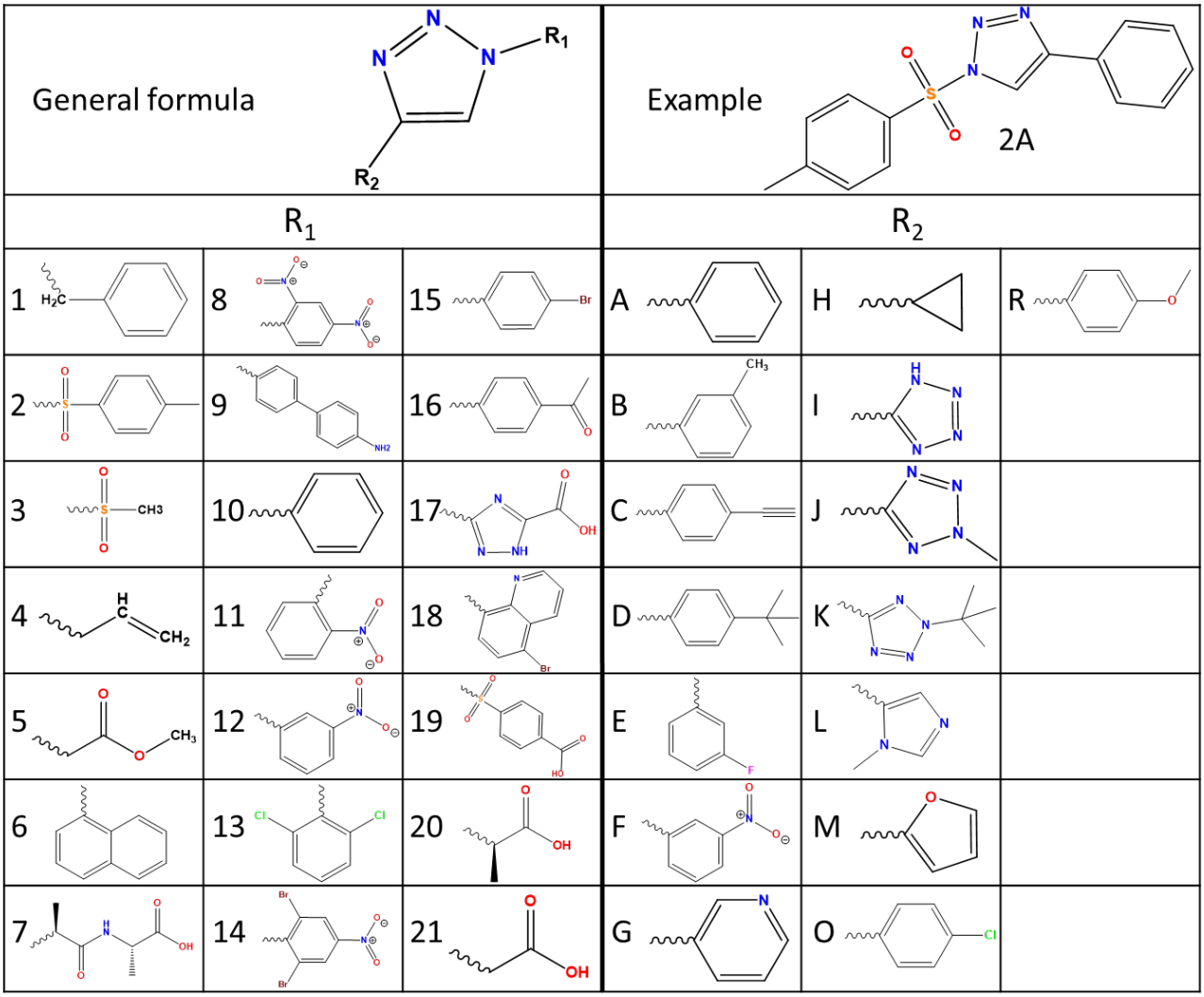
Given the extensive computational volume and significant time requirements, it is more efficient to implement the research algorithm in software to expedite and automate routine stages. This was achieved using Python 3.11.8, as described elsewhere [7]. Molecular docking was performed in two modes: first, the SP mode, which is less accurate but faster; and then the XP mode, which is more accurate but more time-consuming.

Results and Discussions

As a result of molecular docking, GlideScore values were obtained for each ligand, which correspond to the predicted binding energies of ligand-protein complexes. Lower values indicate more stable complexes. Based on these values, compounds can be ranked from best to worst. The first iteration of docking was performed in SP mode, filtering out compounds with scores greater than −8 kcal/mol. The remaining compounds proceeded to the second iteration in XP mode. For the selection of the best compounds, or hits, it is common practice to take the top 10 % for further studies. In our case, compounds with scores greater than −10 kcal/mol were filtered out, and the remaining compounds were accepted as hits, which constituted about 10% of the total.

The hit compounds identified through molecular modeling will be synthesized in the near future and experimentally tested for biological activity against the corresponding biological targets.

© D. I. Guryev, K. M. Verbilo, A. V. Zuraev, 2024



The set of 1,4-disubstituted 1*H*-1,2,3-triazoles available in our laboratory

References

1. Kolb H. C. et al. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions // Angew Chem Int Ed Engl. 2001. Vol. 40, No. 11. P. 2004–2021.

2. Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein–Ligand Complexes / R.A. Friesner et al. // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49, No. 21. P. 6177–6196.

3. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy / R.A. Friesner et al. // J. Med. Chem. 2004. Vol. 47, No. 7. P. 1739–1749.

4. Halgren T.A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening // J. Med. Chem. 2004. Vol. 47, No. 7. P. 1750–1759.

5. Schrödinger | Schrödinger is the scientific leader in developing state-of-the-art chemical simulation software for use in pharmaceutical, biotechnology, and materials research. URL: https://www.schrodinger.com/ (access date: 04.12.2022).

6. Harder E. et al. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins // J. Chem. Theory Comput. 2016. Vol. 12, No. 1. P. 281–296.

7. Mendeleev Readings — 2024. Electronic collection of materials of the International scientific and practical conference on chemistry and chemical education. URL: http://rep.brsu.by/handle/123456789/10067.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-4

WATER AND AIR — SHAPERS OF BIRDS MTDNA EVOLUTION *

Y. Gusarov[1], A. Mikhailova[1], B. Efimenko[1], K. Gunbin[1], A. Bushuev[2], V. Burskaya[3], K. Popadin[1]

[1] *Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*
[2] *Lomonosov Moscow State University*
[3] *University of Antwerp, Belgium*

✉ yurgusguss@mail.ru

Abstract

In mitochondrial DNA (further mtDNA) A>G substitution in protein-coding genes on a heavy strand is the main result of chemical damage (for example, spontaneous deamination). Some vertebrates, like mammals [1] and fishes [2] show strong correlations between mtDNA intense mutagenesis and life-history traits. Here we are trying to discover these connections in birds.

Mitochondria is the main energy productor of the cell with its own DNA molecule. mtDNA is vulnerable to different internal mutagenic factors during replication. Due to replication unevenness, some protein-coding genes mutate more than others [3]. Ones close to the origin of replication (COX1, COX2) spend less time in a single-stranded condition and thus, unlike genes further from origin (CytB), accumulate less mutations. Result of this mutagenic process is A>G substitution on the heavy strand. Recently, different connections between mtDNA mutagenesis speed and life-history traits were discovered for some groups of animals. Amount of mutations in short-living mammals is much lower compared to long-living ones [1]. Fishes, inhabiting warm waters, accumulate more mutations than ones living in cold waters [2]. With this knowledge we decided to discover such connections in birds.

Firstly, we created a database for 766 bird species by using RefSeqs mtDNA data. For each birds we calculated our metric $GhAhSkew = \frac{G - A}{G + A}$, where G shows the amount of guanine in four-fold neutral positions and A shows the amount of adenine in four-fold neutral positions. This metric shows nucleotide shift due to A>G mutation. We also gathered the most amount of ecological data by using AVONET and Birds of the World databases [4, 5]. To investigate our problem, we used methods like t-test, U-test, linear models, PGLS and reconstruction of ancestral states.

With the help of basic statistical methods, we discovered first interesting results. Birds mtDNA protein-coding genes have a gradient of GhAhSkew, same as it was shown in mammals [1]. COX1 and COX2 genes have low GhAhSkew value, CytB has high one. With this result we decided to compare these two groups of animals. We found that birds GhAhSkew value in most genes is higher compared to mammals. The maximum difference was 1.5x times. We made a conclusion that birds' mutagenesis rate was much higher than in mammals. To find out what was behind such a high mutagenesis rate, we started to compare our metric with different birds' life-history traits. We discovered one metric which lowers mtDNA mutagenesis — losing ability to fly, and several which increase it — getting ability to dive and migration type. To our surprise, there was no connection between mutation rate and many simple metrics, like body mass. Then we checked if our discoveries have any phylogenetic value. We checked only two traits — getting ability to dive and losing ability to fly due to the data limitations. For both metrics PGLS showed p-value < 0,05 and Pagel's lambda value $\lambda > 0.9$. These results prove that these two factors are the main reason behind birds' mtDNA nucleotide shift due to A>G mutation. So we decided to find out when the mutagenesis happened and if it continues right now with the same speed. For that we reconstructed mtDNA mutational spectrum for our birds and compared it with our phenotypes. PGLS showed no correlation (p-value > 0,05) and Pagel's lambda value was low ($\lambda < 0,2$). With these results we made a hypothesis that modern birds are now under the influence of stabilizing selection to save the remaining adenines. In this time we saw high numbers of A>G mutspec (~50%) in ancestors of diving birds. We think this is the time when birds accumulated the most amount of mutations, but this assumption needs further research.

We discovered that birds mtDNA is G-rich and its mutagenesis rate is much higher than in mammals. We found several life-history traits which increase mtDNA mutagenesis — getting ability to dive and migration type. But one factor can lower it — losing the ability to fly. We suppose that all mutagenesis effects erupted at the level of the ancestors and nowadays modern birds are under the influence of stabilizing selection. To continue our research we expanded our data by gathering mtDNA information from the MIDORI2 database for more than 7000 bird species [6]. In addition we also got A>G spectra for 789 birds by using the NeMu pipeline [7].

* The study is supported by RSF (project #21-75-20143).

© Y. Gusarov, A. Mikhailova, B. Efimenko, K. Gunbin, A. Bushuev, V. Burskaya, K. Popadin, 2024

References

1. Mikhailova A. G. et al. A mitochondria-specific mutational signature of aging: increased rate of A > G substitutions on the heavy strand // Nucleic Acids Research. 2022. Vol. 50, Iss. 18. P. 10264–10277.

2. Mikhailova A. G. et al. A mitochondrial mutational signature of temperature in ectothermic and endothermic vertebrates. 2020. URL: https://www.researchgate.net/publication/343234365_A_mitochondrial_mutational_signature_of_temperature_and_longevity_in_ectothermic_and_endothermic_vertebrates.

3. Falkenberg M. Mitochondrial DNA replication in mammalian cells: overview of the pathway // Essays Biochem. 2018. Vol. 62 (3). P. 287–296.

4. Tobias J. A., Sheard, C., Pigot, A. L. et al. AVONET: morphological, ecological and geographical data for all birds // Ecology Letters. 2022. Vol. 25. P. 581–597.

5. Birds of the World / edited by S. M. Billerman, B. K. Keeney, P. G. Rodewald, and T. S. Schulenberg. Cornell Laboratory of Ornithology, Ithaca, NY, USA. 2022. URL: https://birdsoftheworld.org/bow/home.

6. Leray M., Knowlton N., Machida R. J. MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences // Environmental DNA. 2022. Vol. 4 (4). P. 894–907.

7. Efimenko B., Popadin K., Gunbin K. NeMu: A Comprehensive Pipeline for Accurate Reconstruction of Neutral Mutation Spectra from Evolutionary Data // Nucleic Acids Research. 2024. Vol. 52, Iss. W1. P. W108–W115.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-5

INSIGHTS ON THE PROTON TRANSLOCATION PATHWAYS IN BACTERIAL F_oF_1-ATP SYNTHASE

L. A. Ivontsin[1], E. V. Mashkovtseva[1,2], Y. R. Nartsissov[1,3]

[1] *Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, Moscow*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[3] *Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Siek, Germany*

✉ ivontsin@icmph.ru

Abstract

Molecular dynamics simulations were used to study the structure of proton half-channels of F_oF_1-ATP synthase. A proton transfer chain consisting of conserved amino acid residues and water molecules clusters was identified. The effect of cardiolipins on protein hydration was evaluated. Mutational analysis was conducted to investigate the role of functional elements of the protein structure in the process of proton transport.

Adenosine triphosphate (ATP) plays a vital role in biochemical processes. In the cell, ATP synthesis is carried out by a universal molecular motor called F_oF_1-ATP synthase, utilizing the energy from a proton electrochemical gradient. Despite recent structural studies leading to the clarification of the proton half-channel's locations, many questions remain unanswered. The key unresolved issue is the coupling of proton transfer with ATP synthesis.

For the investigation of the structure of half-channels and the analysis of potential proton movement areas, molecular dynamics simulations of the membrane F_o factor of ATP synthase from *E. coli* embedded in three types of lipid bilayer corresponding to different biological cell states.

It was found that the inlet half-channel had a composite structure, including an aqueous cavity in the protein *a*-subunit through which protons penetrated into the half-channel, and the narrow tract in the region near the key *c*D61 residue of the *c*-subunit. In this bottleneck, a sequence of conserved amino acid residues (*a*E219, *a*D119, *a*H245, *a*N214, and *a*Q252) forming a proton transfer chain was discovered. Additionally, we detected the localization of three structural water molecule clusters (W1–W3) that were necessary for the proton transport continuity. Existence of stable spatial positions (SP) of the significant amino acid side chain of *a*N214 was a necessary condition for facilitating proton transport [1]. The influence of cardiolipin content on half-channels hydration was examined. The outlet half-channel was a water-filled cavity through which a proton could easily move in bulk [2]. Mutational analysis was conducted to investigate the role of functional elements of the protein structure in the process of proton transport [3]. The results of MD simulations of the mutant enzyme indicate that substitutions of conserved polar residues significantly affected hydration levels, leading to drastic changes in the occupancy and capacity of the structural water molecule clusters (W1–W3), up to their complete disappearance and consequently to the proton transfer chain disruption.

References

1. Ivontsin L. A., Mashkovtseva E. V., Nartsissov Y. R. Insights on the proton translocation pathways in F_oF_1-ATP synthase using molecular dynamics simulations // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2022. Vol. 717. P. 109135.

2. Ivontsin L. A., Mashkovtseva E. V., Nartsissov Y. R. Membrane lipid composition influences the hydration of proton half-channels in F_oF_1-ATP synthase // Life. 2023. Vol. 13 (9). P. 1816.

3. Ivontsin L. A., Mashkovtseva E. V., Nartsissov Y. R. Molecular dynamics simulations of the mutated proton-transferring a-subunit of *E. coli* F_oF_1-ATP synthase // Intern. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25 (10). P. 5143.

© L. A. Ivontsin, E. V. Mashkovtseva, Y. R. Nartsissov, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-6

ANALYSIS OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ANTIPHAGE DEFENSE SYSTEMS *

G. Jdeed[1], V. V. Morozova[2], N. V. Tikunova[2]

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

✉ ghadeerjdeed@outlook.com

Abstract

Stenotrophomonas maltophilia exhibits intrinsic high-level of resistance to a variety of antibiotics and is an opportunistic pathogen, the World Health Organization lists it as one of the leading drug-resistant pathogens in hospitals worldwide. With the rise of antibiotic resistance, bacteriophages appear to be the promising alternative.

Bacteria have developed a wide array of diverse anti-phage defense mechanism. The goal of the research was to conduct a pangenome analysis of locally and globally sequenced *S. maltophilia* strains in search for anti-phage defense systems, their integration hotspots and their level of conservation.

Pangenome analysis of 72 complete *S. maltophilia* strains genomes revealed a high level of heterogeneity with shared genes present in all strains constituting 4% of all genes.

A total of 71 diverse antiphage defense systems and subsystems were found in *S. maltophilia* complex. The systems varied widely among the strains with the most commons ones being Wadjet type I, which is suggested to be anti-foreign DNA in the form of plasmids or phage ssDNA, followed by restriction modification system type II, then Gabija system and the restriction modification systems (RM type IV, RM type I and RM type IIG), respectively. Interestingly, complete CRISPR/Cas systems were rarely found (8% of studied strains) (Fig. 1), compared with their general percentage of distribution among bacteria (42%). Only Wadjet I and AbiE 4 were found to be highly conserved, while the other systems were very variable among different strains (Fig. 2).

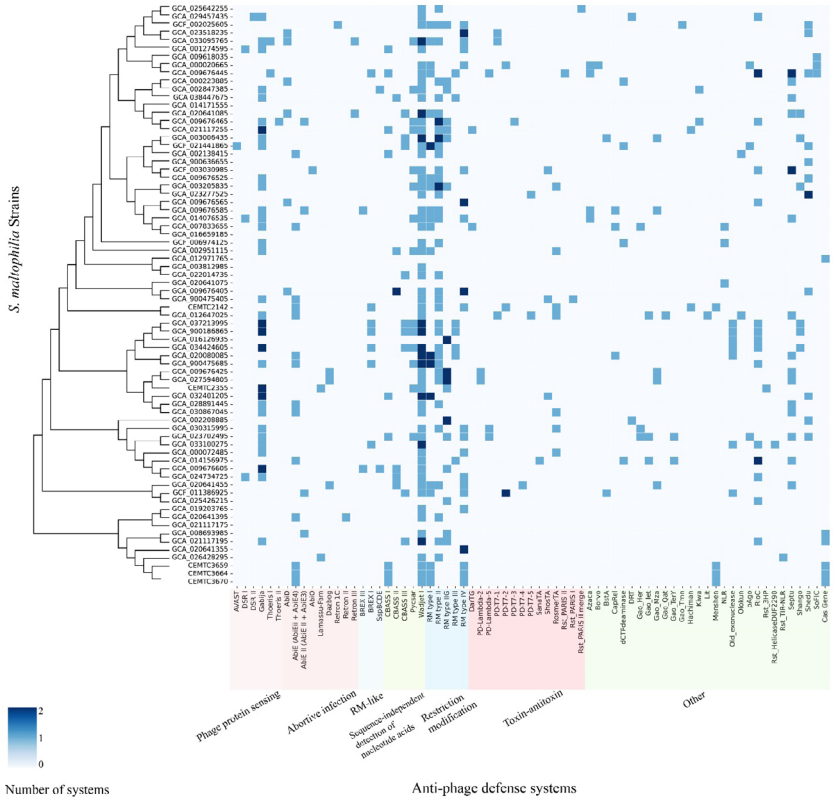


Fig. 1. Distribution of anti-phage defense systems in *S. maltophilia*

* The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project #075-15-2021-1085).
© G. Jdeed, V. V. Morozova, N. V. Tikunova, 2024



Fig. 2. Conservation of genes consitituting anti-phage defense systems in *S. maltophilia*

The anti-phage defense systems were found to be distributed in fixed integration sites across the studied strain, 28 integration sites were found, 4 of them contained more than 50 % of the instances of the anti-phage defense systems (Fig. 3).

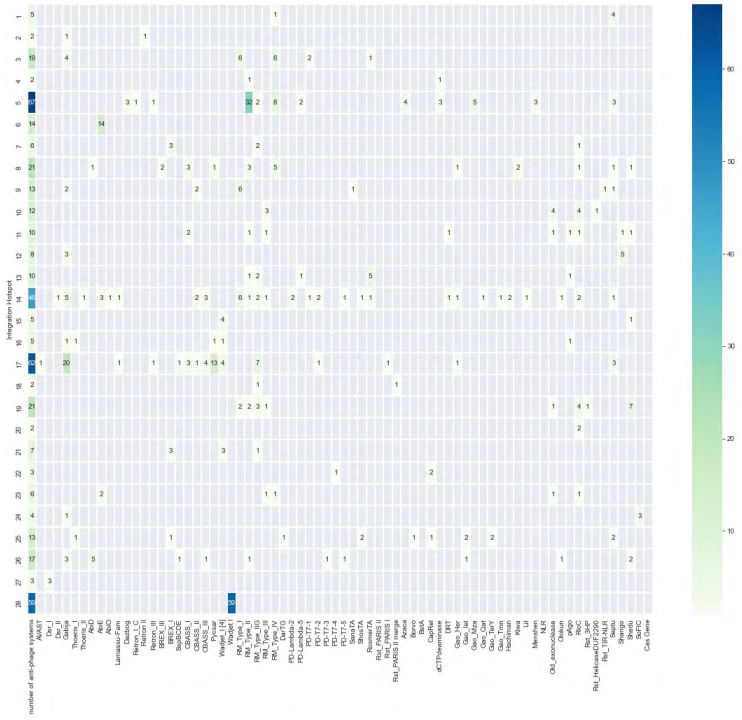


Fig. 3. Integration sites of anti-phage defense systems in *S. maltophilia*

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-7

UV LIGHT EXPOSURE IN AMPHIBIAN GENOMES: CC:GG>TT:AA

V. V. Lobanova, A. G. Mikhaylova, K. Y. Popadin

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad

✉ valeriavlobanova@gmail.com

Abstract

In this work, we show that the nuclear and mitochondrial genomes of amphibians exhibit increased frequencies of CC:GG>TT:AA dinucleotide mutations compared to other groups of vertebrates. We suggest that this may be due to exposure to ultraviolet radiation during the sensitive period of embryonic development.

External exposure to mutagens is one of the factors driving the molecular evolution of species and classes. For example, one of the strong mutagens influencing the occurrence of DNA damage and, as a consequence, substitutions and rearrangements, is ultraviolet light.

It has been shown that the signature of UV light has a known pattern, doublet base substitution CC>TT (DBS1 COSMIC sign [1]). We hypothesize that since amphibians may inhabit solar environments and have transparent eggs [2] they may have increased UV light explosion and the following increase in rates of CC:GG>TT:AA, observed in neutral sites (4-fold positions). Analysing whole nuclear genomes of dozens of amphibian species we have shown that indeed genomes accumulate TT- and AA-rich codons following the increased frequencies of CC:GG>TT:AA. It leads to an amino acid shift toward an increase in Asn, Lys and Leu, Phe, while Pro and Gly become losers.

References

1. Chen J. M., Férec C., Cooper D. N. Patterns and mutational signatures of tandem base substitutions causing human inherited disease // Human mutation. 2013. Vol. 34 (8). P. 1119–1130.

2. Londero J. E. L., Dos Santos M. B., Schuch A. P. Impact of solar UV radiation on amphibians: focus on genotoxic stress // Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2019. Vol. 842. P. 14–21.

© V. V. Lobanova, A. G. Mikhaylova, K. Y. Popadin, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-8

COMPARATIVE ANALYSIS OF AMINO ACID SEQUENCES OF S8 PEPTIDASE FROM *BACILLUS* SPP.

G. D. Milovidov, T. S. Tikhomirova, V. A. Nemashkalov

Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino

✉ Knorih@gmail.com

Abstract

Serine proteases are widely used in various fields, including the food industry and medicine. Modern enzymes have high activity and broad substrate specificity, the characteristics of which are influenced by both external conditions and intramolecular features. This study examines the amino acid sequences of proteases belonging to the S8 family from *Bacillus* spp. to evaluate the intramolecular determinants affecting their enzymatic properties.

Members of the genus *Bacillus* are producers of a large number of enzymes with applications across various human activities [1–3]. Among these enzymes, a notable group includes serine proteases, also known as subtilisins. These hydrolases exhibit broad substrate specificity and are used in the production of functional foods, dietary supplements, cosmetics, and household chemicals. Furthermore, the fibrinolytic activity of microbial serine proteases, such as nattokinase, An6 fibrinase (BAF1), CFR 15 protease, and bacillokinase II, has demonstrated potential for thrombolytic therapy of cardiovascular diseases by targeting fibrin degradation [3].

Most serine proteases consist of a peptidase domain belonging to the S8 family and a signal peptide I9 [4, 5]. The I9 domain, consisting of at least 100 amino acids, acts as an intramolecular chaperone, facilitating the secretion of mature protease. This domain also exhibits transient inhibitory activity, which diminishes as it is cleaved by the associated protease. The presence of the I9 domain is crucial for maintaining high protease activity. In contrast, the peptidase domain S8, composed of 250–280 amino acids, is responsible for the primary proteolytic activity by a highly conserved active center, containing Asp, His, and Ser residues.

To assess the conservation level of S8 peptidases among *Bacillus* spp., a comparative analysis of amino acid sequences was conducted. A pairwise alignment of 2045 sequences of S8 peptidases from *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, and *Lederbergia lenta* (obtained from the NCBI Protein database https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/) was performed using ClustalOmega software. Percent identity was then calculated using Python v.3.6.12. The results of this analysis revealed seven distinct clusters among the available sequences (Fig. 1a).

As can be seen (see Fig. 1a), the sequences of S8 peptidases for these strains are not conserved, which may affect the degree of their activity. However, the average amino acid composition for all S8 peptidases used in the analysis

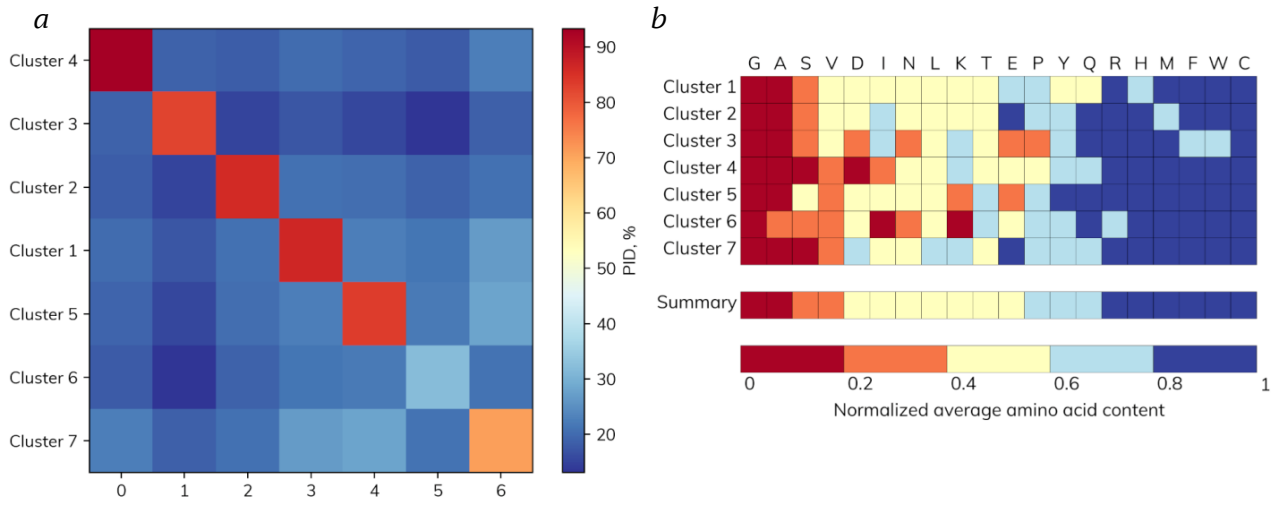


Fig. 1. Comparative analysis of 2045 amino acid sequences of S8 peptidases from *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, and *Lederbergia lenta* strains: *a* — symmetric matrix of average percent identity (PID) values; *b* — average amino acid composition. Normalization was carried out using the min-max method

© G. D. Milovidov, T. S. Tikhomirova, V. A. Nemashkalov, 2024

was similar (Fig. 1b). S8 peptidases from *Bacillus* species are characterized by a high abundance of Gly and Ala residues, while Arg, His, Met, Phe, Trp, and Cys residues are virtually absent. Using the AlphaFold2 tool, tertiary structures were predicted based on consensus sequences for these seven distinct clusters of S8 peptidases (Fig. 2).

The overlay of the predicted tertiary structures for the seven S8 peptidase clusters reveals a highly conserved spatial organization of the enzyme core and active site, with the exception of disordered regions. Despite significant sequence variability, this indicates a high degree of conservation in both amino acid composition (see Fig. 2b) and intramolecular structure among serine proteases from *Bacillus* species. This structural consistency likely plays a critical role in defining the proteolytic activity of these enzymes.

The obtained results will be used both for further in-depth bioinformatics analysis and for identifying important sequence features responsible for the increased activity of proteases from *Bacillus* spp.

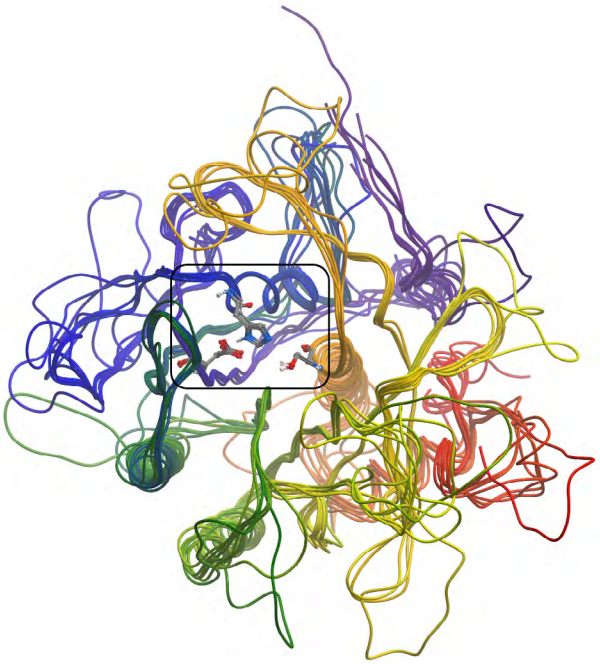


Fig. 2. Comparison of predicted tertiary structures of consensus S8 peptidase sequences from seven clusters

References

1. Gu J., Qiu Q., Yu Y. et al. Bacterial transformation of lignin: key enzymes and high-value products // Biotechnol. Biofuels Bioprod. 2024. Vol. 17. P. 2.

2. Sheng Y., Yang J., Wang C. et al. Microbial nattokinase: from synthesis to potential application // Food Funct. The Royal Society of Chemistry. 2023. Vol. 14, No. 6. P. 2568–2585.

3. Singh R., Gautam P., Sharma C., Osmolovskiy A. Fibrin and fibrinolytic enzyme cascade in thrombosis: Unravelling the role // Life. 2023. Vol. 13, No. 11. P. 2196.

4. Kojima S., Minagawa T., Miura K. The propeptide of subtilisin BPN' as a temporary inhibitor and effect of an amino acid replacement on its inhibitory activity // FEBS Lett. 1997. Vol. 411, No. 1. P. 128–132.

5. Li Y., Hu Z., Jordan F., Inouye M. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270, No. 42. P. 25127–25132.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-9

EFFECT OF MUTAGENS ON THE STABILITY OF MITOCHONDRIAL GENOME *

N.A. Ree[1], N.A. Potapova[1], N. S. Van Leiden[1], K.V. Gunbin[1], K.Y. Popadin[1,2]

[1] *Center for Mitochondrial Functional Genomics, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*
[2] *Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, Switzerland*

✉ nataliaree1985@gmail.com

Abstract

In our study, we explored how various mutagenic agents impact mitochondrial DNA (mtDNA) stability. We analyzed 2448 whole-genome sequencing samples, focusing on induced pluripotent stem cells exposed to environmental mutagens. Not all agents affected mtDNA content, but 13 increased mutations approximately twofold. The dominant mutation type was G>A, and 1,2-dimethylhydrazine (DMH) stood out as a distinctive mutagen.

The question of what factors influence the mutation rate of the mitochondrial genome remains an ongoing puzzle. Specifically, there's a discrepancy concerning the role of reactive oxygen species (ROS) produced by mitochondria in mtDNA instability. The central issue revolves around whether mitochondrial membranes permit mutagens from the environment to traverse and induce mutations.

In our study, we set out to explore the impact of various mutagenic agents on mtDNA stability. Here are the key steps and findings:

We analyzed 2448 whole-genome sequencing (WGS) samples from the study conducted by Kucab et al. in 2019 [1]. In that study, induced pluripotent stem (IPS) human cells were exposed to 79 known or suspected environmental carcinogens or were maintained in different control media. To process the data, we realigned the CRAM files to the human reference genome (hg38). Subsequently, we selected only the reads aligned to the mitochondrial chromosome (chrM) and unmapped reads. These were further trimmed using TRIMMOMATIC (ver. 0.39). The trimmed reads were then aligned to hg38 using BWA MEM, and somatic mutation calling was performed with MitoHPC (ver. of 6 March 2024). We specifically focused on mutations with an allelic frequency (AF) less than 0.15.

As it turns out, not all mutagenic agents affected mitochondrial ploidy. Among the agents tested, 16 increased mtDNA content, while 27 decreased it. Interestingly, their effects were not linked to the chemical nature of the agents or their biological roles. Only 13 agents significantly increased the quantity of mutations in mtDNA, approximately twofold compared to the control (water). Notably, in six cases, this increase was concentration-dependent. The dominant mutation type observed was G>A. One particular mutagen stood out: DMH. This agent, known for its role in alkylation, left a distinctive signature on mtDNA.

In our research, we devised a classification system for mitochondrial mutagens based on their chemical nature and functional impact within mitochondria [2]. However, intriguingly, we haven't yet discovered compelling evidence that specific chemical classes or functional roles directly dictate the mutation spectrum. Instead, we're leaning toward the idea of indirect damage to mtDNA—perhaps arising from reactive oxygen species (ROS) formation.

Overall, while mutations in mitochondrial genomes appear to be largely unaffected by environmental mutagens, some agents do influence mitochondrial copy numbers, leading to an overall increase in mutations.

In summary, our study sheds light on the complex interplay between mutagenic agents, mitochondrial stability, and the delicate dance of mtDNA mutations.

References

1. Kucab J.E. et al. A compendium of mutational signatures of environmental agents // Cell. 2019. Vol. 177, No. 4. P. 821–836.

2. Van Leiden N.S. et al. Development of a classification for mitochondrial mutagens: analysis of the chemical nature of mutagens and their functional properties // Modern Science: Current Problems of Theory and Practice. Series: Natural and Technical Sciences. 2023. Vol. 09/2. P. 6–10.

* The study is supported by RSF (project #21-145-20143).

© N.A. Ree, N. Potapova, N.S. Van Leiden, K.V. Gunbin, K.Y. Popadin, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-10

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАК ЭТАП ДИЗАЙНА ЧАСТИЧНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА *

PHYLOGENETIC ANALYSIS AS A STEP OF HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR PARTIAL AGONIST DESIGN

А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв

Белорусский государственный медицинский университет, Минск

A. A. Akunevich, V. V. Khrustalev

Belarusian State Medical University, Minsk

✉ akunevichna@gmail.com

Аннотация

Для EGF подсемейства Bovinae и семейства Cervidae характерно изменение положения остатков Cys в N- и C-концевых фрагментах. C-концевой фрагмент EGF (Glu40–Trp49) является наиболее перспективной областью для внесения аминокислотной замены в ходе дизайна его мутантной формы со сниженной агонистической активностью, поскольку для данного участка характерна наименьшая изменчивость в процессе эволюции.

Abstract

In the EGF structure of the Bovinae subfamily and the Cervidae family, there are changes in the Cys position in the N- and C-terminal fragments. The C-terminal fragment (Glu40–Trp49) is the most promising region for introducing an amino acid substitution during the design of its mutant form with reduced agonistic activity, since this region is characterized by the least variability during the process of evolution.

Для эпителиальных опухолей характерна аберрантная активация EGFR, что способствует пролиферации, ангиогенезу, метастазированию и ингибированию апоптоза опухолевых клеток [1]. В качестве перспективных противоопухолевых агентов, связывающих внеклеточные домены EGFR, рассматриваются его нативные лиганды с измененной аминокислотной последовательностью, которые обладают антагонистической или частичной агонистической активностью [2]. В ходе дизайна мутантной формы EGF необходимо рассмотреть замены, которые еще не наблюдались среди гомологов семейства EGF-подобных факторов роста в сайтах связывания лиганда с рецептором.

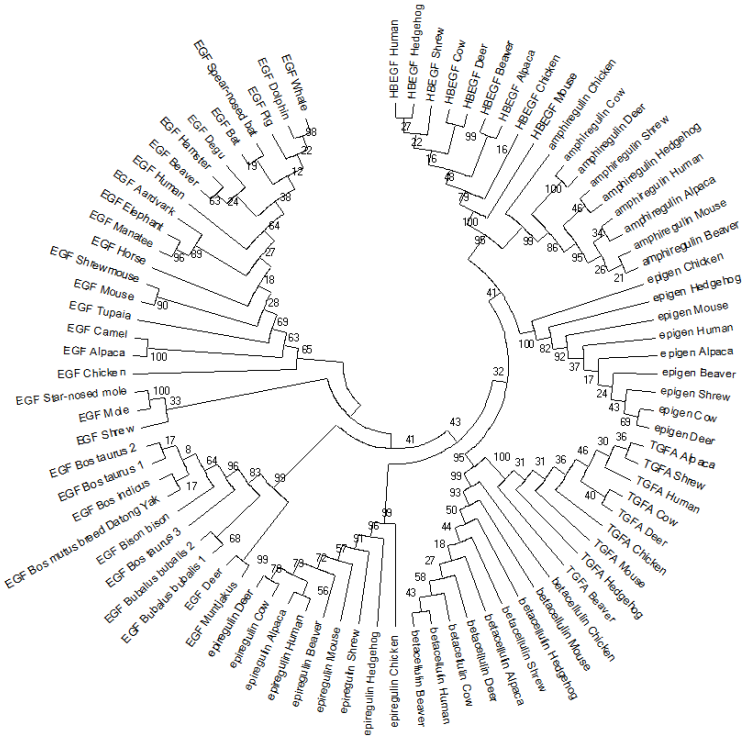
Для филогенетического анализа использовали 32 аминокислотные последовательности EGF и по 9 аминокислотных последовательностей TGF-α, HB-EGF, эпирегулина, эпигена, амфирегулина и бетацеллюлина из баз данных Uniprot, Ensembl и GenBank. Выравнивание последовательностей EGF-подобных факторов роста и построение филогенетического дерева по методу UPGMA на основании эволюционной аминокислотной дистанции JTT осуществлялось в программе MEGA 10. Предсказание порядка образования дисульфидных связей проводилось с помощью алгоритма CysCon [3].

Как видно на рисунке, последовательности EGF подсемейства Bovinae и семейства Cervidae настолько отличаются от EGF остальных млекопитающих, что группируются на общей ветви с другими пептидами семейства EGF-подобных факторов роста.

У всех пептидов семейства EGF-подобных факторов роста млекопитающих сохраняются все 6 остатков Cys в соответствующих положениях EGF-подобного домена, тогда как в последовательностях EGF различных видов быков 1-й остаток Cys находится в 2-м положении, а не в 6-м. Одна из последовательностей EGF *Bubalis bubalis* содержит остаток Cys и в 2-м, и в 6-м положении, а другая — только в 2-м. По всей видимости, в геноме *Bubalis bubalis* сохранилась мутация, которая была характерна для общего предшественника быков: сначала возникло 2 остатка Cys в N-концевом фрагменте EGF, а затем исходный остаток в 6-м положении заместился на Gly у всех остальных видов быков. Тем не менее даже после подобных существенных перестроек EGF *Bos taurus* сохраняет функциональную активность [4]. Согласно алгоритму CysCon, паттерн образования дисульфидных связей в данной структуре также не нарушен: остаток Cys2 образует дисульфидную связь с остатком Cys20,

* Исследование выполнено при поддержке БРФФИ (проект № Б20М-025).

© А. А. Акуневич, В. В. Хрусталёв, 2024



Филогенетическое дерево пептидов семейства EGF-подобных факторов роста человека и животных

а остаток Cys14 — с остатком Cys31. Отсюда следует, что N-конец EGF быков находится в абсолютно отличной конформации от той, которая формируется в случае образования дисульфидной связи Cys6–Cys20 в других пептидах семейства EGF-подобных факторов роста. Помимо этого, в последовательностях EGF *Cervus elaphus* и *Muntiacus muntjak* имеется дополнительный остаток Cys47 на С-конце пептида. Согласно результатам CysCon, данный дополнительный остаток не влияет на порядок образования дисульфидных связей в EGF *Muntiacus muntjak*, однако дополнительная дисульфидная связь Cys42–Cys47 предсказывается в EGF *Cervus elaphus*, в котором Cys33 заменился на остаток Tyr. Такая модификация С-конца пептида также существенно не снизила сродство EGF к EGFR. Вероятно, EGF подсемейства Bovinae и семейства Cervidae приобрел даже большую аффинность к EGFR, чем можно объяснить высокую эффективность использования эмбриональной бычьей сыворотки в выращивании культур клеток.

В структуре EGF наиболее важными для связывания с EGFR остатками являются Tyr13, Leu15, His16, Ile23, Ala25, Leu26, Tyr37, Arg41, Gln43 и Leu47 [5]. При этом в ходе филогенеза некоторые из данных остатков могут замещаться на остатки того же класса (например: Ile23 — на Val, Leu, Phe; Leu26 — на Val, Ile, Ala; Tyr37 — на Phe; Leu47 — на Phe, Ile) либо другого класса (например: His16 — на Asn; Leu26 — на Asp; Gln43 — на Glu). Отмеченная эволюционная «гибкость» EGF свидетельствует о возможности структурных перестроек его комплекса с EGFR. Соответственно, все замены, уже произошедшие в структуре EGF разных видов животных, существенно не изменят активность EGF.

По результатам филогенетического анализа, наиболее перспективной областью для внесения аминокислотной замены при дизайне мутантной формы EGF со сниженной агонистической активностью является С-концевой фрагмент пептида (Glu40–Trp49), поскольку данный участок характеризуется наименьшей изменчивостью в процессе эволюции. Исходя из анализа трехмерных структур EGF и его комплексов с EGFR [5], мутантные формы EGF с заменами в данном участке могут влиять как на стабильность его димеров, так и на аффинность к III домену EGFR.

Литература

1. Roskoski R. Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer // Pharmacological Research. 2014. Vol. 78. P. 34–74.

2. Panosa C., Tebar F., Ferrer-Batallé M. et al. Development of an epidermal growth factor derivative with EGFR blocking activity // PLoS One. 2013. Vol. 8 (7). P. e69325.

3. Yang J., He B. J., Jang R. et al. Accurate disulfide-bonding network predictions improve *ab initio* structure prediction of cysteine-rich proteins // Bioinformatics. 2015. Vol. 31. P. 3773–3781.

4. Luo Y., Zhang R., Gao J. et al. The localization and expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in bovine ovary during oestrous cycle // Reproduction in Domestic Animals. 2020. Vol. 55. P. 822–832.

5. Ogiso H., Ishitani R., Nureki O. et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains // Cell. 2002. Vol. 110 (6). P. 775–787.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРОГОВ АКТИВАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ К ФНО-А НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ К НЕМУ *

INVESTIGATING ACTIVATION THRESHOLDS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS TO TNF BASED ON ITS SURFACE RECEPTOR EXPRESSION

С. Алрхмун[1,2], Р. Ю. Перик-Заводский[1,2], О. Ю. Перик-Заводская[2], Ю. А. Лопатникова[1,2], Ю. В. Жукова[1,2], Ю. А. Шевченко[1,2], М. О. Волынец[2], Ш. К. Сулейманов[1], Н. А. Сивицкая[1], Ф. Д. Киреев[2], А. А. Альшевская[1], С. В. Сенников[1,2]

[1]Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова
[2]НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

S. Alrhmoun[1,2], R. Y. Perik-Zavodskii[1,2], O. Y. Perik-Zavodskaia[2], J. A. Lopatnikova[1,2], J. V. Zhukova[1,2], J. A. Shevchenko[1,2], M. O. Volynets[2], Sh. K. Suleymanov[1], N. A. Sivitskaya[1], F. D. Kireev[2], A. A. Alshevskaya[1], S. V. Sennikov[1,2]

[1]Sechenov First Moscow State Medical University
[2]Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ saleh.alrhmoun1@gmail.com

Аннотация

Фактор некроза опухоли альфа (ФНО-а) является ключевым провоспалительным цитокином в патогенезе ревматоидного артрита (РА), и увеличение его экспрессии вызывает системные эффекты, характерные для РА [1, 2]. Биологическая терапия, воздействующая на ФНО-а, революционизировала терапию РА [3, 4], подчеркнув его роль в прогрессировании и тяжести заболевания. Наше исследование выявило снижение порогов активации моноцитов к ФНО-а у пациентов с РА по сравнению со здоровыми донорами.

Abstract

Tumor necrosis factor alpha (TNF-α) is a key pro-inflammatory cytokine in rheumatoid arthritis (RA) pathogenesis, with its overexpression driving systemic effects characteristic of RA [1, 2]. Targeting TNF-α with biologic therapies has revolutionized RA management [3, 4], highlighting its role in disease progression and severity. Our study revealed that monocytes from patients with RA exhibit lower activation thresholds for TNF-α compared to healthy donors.

Цель — определение полного транскриптома (WTA) и иммунопротеомного профиля (10 поверхностных белков) единичных мононуклеарных клеток из крови здоровых доноров (n = 3) и пациентов с РА (n = 3), а также оценка эффектов добавления ФНО-а в обеих группах.

Материалы и методы. Мы выделили мононуклеарные клетки из крови здоровых доноров и пациентов с ревматоидным артритом методом центрифугирования в градиенте плотности Фиколла. Затем мы окрашивали выделенные мононуклеарные клетки антителами, конъюгированными с молекулярными штрихкодами Sample Tag для мультиплексирования, и 10 маркерами AbSeq (CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD45RA, CD45RO, CD56, CD120A и CD120B) для иммунопротеомного профилирования. Затем окрашенные клетки были загружены в платформу BD Rhapsody Express для мультиомного профилирования. Для захвата молекул поли-А были использованы магнитные бусы с молекулярными штрихкодами, после чего был проведен лизис клеток и непосредственная гибридизация поли-А молекул лизированных клеток с бусами. Молекулы поли-А подвергли обратной транскрипции для синтеза кДНК, которая затем была амплифицирована с помощью двух циклов полугнездовой ПЦР и одного цикла гнездовой ПЦР, в результате чего были получены финальные библиотеки полного транскриптома (WTA), AbSeq и Sample Tag. Эти библиотеки были объединены и секвенированы на приборе NovaSeq 6000 (R1 = =71, R2 = 51, проточная ячейка S1).

* Исследование полного транскриптома выполнено за счет гранта РНФ (проект № 20-75-10051-П), исследование иммунопротеомного профиля выполнено при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», реализуемой на базе ФГАО ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

© С. Алрхмун, Р. Ю. Перик-Заводский, О. Ю. Перик-Заводская, Ю. А. Лопатникова, Ю. В. Жукова, Ю. А. Шевченко, М. О. Волынец, Ш. К. Сулейманов, Н. А. Сивицкая, Ф. Д. Киреев, А. А. Альшевская, С. В. Сенников, 2024

Полученные файлы FASTQ были обработаны с использованием BD pipeline версии 2.2 для получения финальных матриц экспрессии генов. Затем эти матрицы были проанализированы с помощью пакета Seurat V5 на языке программирования R. Первоначально матрицы экспрессии генов и белков прошли процедуру контроля качества, а затем были интегрированы. Из объединенных матриц были идентифицированы наиболее вариабельные гены и белки. Данные об экспрессии генов были нормализованы с использованием пакета SCTransform в R с акцентом на идентифицированы вариабельные гены, в то время как данные об экспрессии белков были нормализованы с использованием метода Centered Log-ratio (центрированного логарифмического отношения). Для снижения размерности к нормализованным матрицам был применен анализ главных компонент (PCA). Эффект партии был скорректирован с помощью пакета Harmony в R. Далее было выполнено мультиомное снижение размерности с использованием метода WNN UMAP на скорректированных с помощью Harmony главных компонентах экспрессии генов и белков. Кластеры клеток были идентифицированы и вручную аннотированы на основе профилей экспрессии поверхностных белков и генов. Затем мы использовали пакет AUCell для идентификации клеток с активной генной сигнатурой, связанной с клеточным ответом на ФНО-а. После этого, используя анализ второй производной полиномиальной кривой, построенной по данным AUCell и экспрессии рецепторов к ФНО-а, нашли пороги активации клеток при помощи ФНО-а.

Результаты. Классические моноциты у пациентов с РА показали низкий порог активации по сравнению со здоровыми донорами. Это предполагает, что моноциты у пациентов с РА активируются легче, что может способствовать хроническому воспалению, характерному для этого заболевания.

При добавлении ФНО-а к моноцитам от здоровых доноров мы наблюдали умеренное снижение порога активации. Это указывает на то, что ФНО-а может праймировать моноциты, делая их более восприимчивыми к активации, даже при отсутствии заболевания.

Что касается моноцитов у пациентов с РА, то добавление ФНО-а привело к заметному снижению порога активации, более выраженному по сравнению со здоровыми донорами. Это предполагает, что моноциты у пациентов с РА уже находятся в предварительно активированном состоянии и что ФНО-а усугубляет это состояние, потенциально способствуя усилению воспалительной реакции, характерной для РА.

Выводы. Различия в реакции на ФНО-а между здоровыми донорами и пациентами с РА указывают на измененную чувствительность классических моноцитов при РА, где даже низкие уровни ФНО-а могут вызывать значительную активацию. Это может объяснить сохранение и усиление воспаления при РА. Результаты подчеркивают повышенную реактивность моноцитов при РА и критическую роль ФНО-а в модуляции этого ответа, предлагая потенциальную информацию для разработки целенаправленных терапевтических стратегий.

Литература

1. Jang D. I., Lee A. H., Shin H. Y. et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-α) in Autoimmune Disease and Current TNF-α Inhibitors in Therapeutics // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22 (5). P. 2719.

2. Samimi Z, Kardideh B., Chalabi M. et al. Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) does not have any correlation with disease activity in rheumatoid arthritis patients treated with disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) // Brazilian Journal of Pharmaceutical Science. 2019. Vol. 56 (6).

3. Farrugia M., Baron B. The role of TNF-α in rheumatoid arthritis: a focus on regulatory T cells // J. Clin. Transl. Res. 2016. Vol. 2 (3). P. 84–90.

4. Furst D. Development of TNF inhibitor therapies for the treatment of rheumatoid arthritis // Clinical and Experimental Rheumatology. 2009. Vol. 28. P. S5–12.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-12

СДВИГ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ НУКЛЕОТИДОВ МЕЖДУ ЛИДИРУЮЩЕЙ И ОТСТАЮЩЕЙ ЦЕПЯМИ БАКТЕРИЙ ВЫЗВАН АССИМЕТРИЧНЫМ МУТАГЕНЕЗОМ *

NUCLEOTIDE BIAS BETWEEN LEADING AND LAGGING STRAND IN BACTERIA IS CAUSED BY ASYMMETRIC MUTAGENESIS

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

[1] *Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград*
[2] *Школа биологических наук факультета биологии, медицины и здравоохранения Манчестерского университета, Великобритания*

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

[1] *Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad*
[2] *School of Biological Sciences, Faculty of Biology, Medicine and Health, The University of Manchester, United Kingdom*

✉ badamshin124@gmail.com

Аннотация

Эксперимент по накоплению мутаций — это общепринятая техника получения наиболее чистого мутационного спектра. Согласно правилу четности 1 (гипотеза), частоты комплементарных мутаций должны быть равны. По этой причине в данных исследованиях наиболее часто применяется 6-компонентный мутационный спектр (2 пары оснований × 3 возможные мутации), который не различает комплементарные мутации (например, C>T и G>A), частоты накопления которых на лидирующей и отстающей цепях могут различаться. В данной работе мы представляем 12-компонентный мутационный спектр, построенный с учетом направления репликации и способный наглядно продемонстрировать разницу в накоплении мутаций между лидирующей и отстающей цепями ДНК бактерий.

Abstract

The Mutation Accumulation Experiment (MAE) is a commonly employed technique to obtain the most pure mutational spectrum. According to the parity rule 1 (hypothesis) frequencies of complementary mutations have to be equal. For this reason, the 6-component mutation spectrum (2 base pair types × 3 possible mutations) is commonly used in research which doesn't differentiate between complementary mutations (e.g. C>T and G>A), some which accumulates on leading and lagging strands differently. In this work we present 12-component strand-specific mutation spectra which is able to show difference in mutation accumulation between leading and lagging DNA strands of various bacteria.

Введение

Эксперимент по накоплению мутаций (mutation accumulation experiment, MAE) — это распространенный метод для получения наиболее чистого мутационного спектра [1]. В подобных исследованиях обычно используется 6-компонентный мутационный спектр (2 пары оснований × 3 возможные мутации) для различных видов бактерий.

Согласно правилу четности 1 (гипотеза), частоты комплементарных мутаций равны между собой [2]. По этой причине 6-компонентный мутационный спектр наиболее часто применяется в подобных исследованиях. Данный подход не разделяет комплементарные мутации (например, C>A и G>T как G:C>T:A), считая их частоты равными и уменьшая таким образом количество возможных мутаций с 12 до 6. В данной работе мы предлагаем метод 12-компонентного мутационного спектра (см. рисунок), построенного с учетом особенностей процесса репликации у бактерий, для изучения асимметрии в накоплении различных типов мутаций между лидирующей и отстающей цепями, а также степени ее вклада в проявление эффекта GC-скоса у бактерий [3].

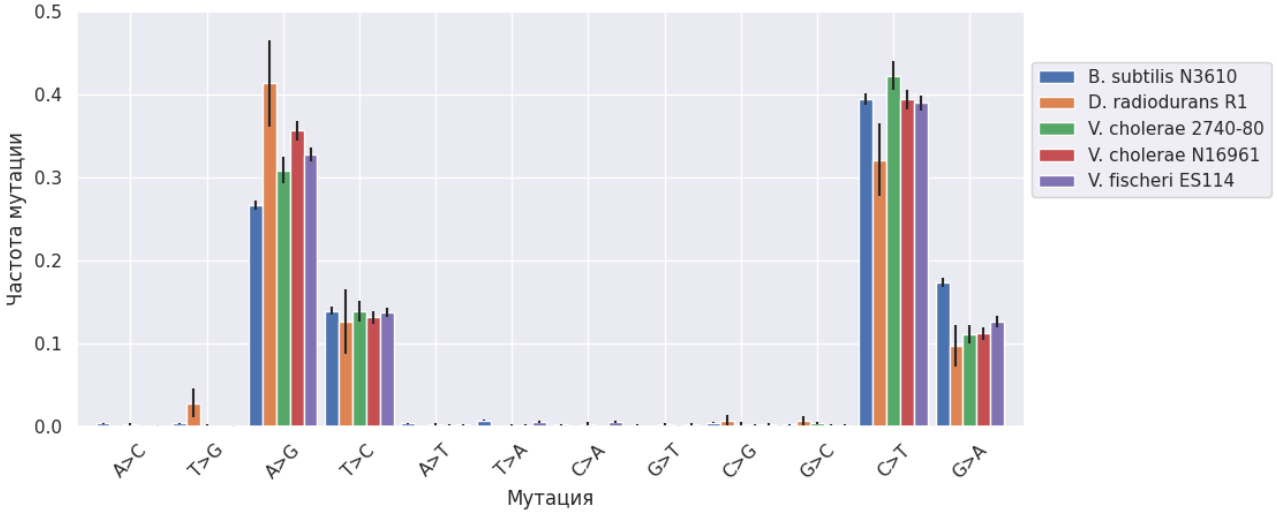
Методы

На основании данных экспериментов по накоплению мутаций для диких линий, а также линий с различными мутационными повреждениями репарации в 7 видах бактерий [4–9] были построены 12-компонентные мутационные спектры для матрицы отстающей цепи, нормализованные к 1 (см. рисунок). Частоты мутаций рассчитывались по формуле: $\mu = m/nT$, где μ — частота мутации, m — число наблюдаемых мутаций, n — число

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 21-75-20145).

© Э. А. Бадамшин, А. В. Скуднов, К. Ю. Попадьин, К. В. Гунбин, С. В. Денисов, 2024

сайтов, *T* — общее число поколений в эксперименте. Для расчета стандартных отклонений и подтверждения статистической значимости результатов использовалась 1000 итераций бутстрепа. Позиции точек начала (origins) и окончания (терминации) репликации были предсказаны с помощью Ori-Finder 2022 [10].



12-компонентный мутационный спектр матрицы отстающей цепи для линий бактерий с дефицитом репарации MMR (ΔMutS/-L). Шкала погрешностей — стандартное отклонение

Результаты

1. В паре транзиций G:C>A:T мутация C>T встречалась значительно чаще, чем комплементарная G>A на матрице отстающей цепи во всех анализируемых линиях бактерий (см. рисунок). Наименьшей разница была у вида *Mycobacterium smegmatis,* в котором отсутствует система репарации MMR (mismatch repair) [9].

2. В мутациях A:T>G:C, мутация A>G происходит значительно чаще, чем T>C на матрице отстающей цепи во всех видах линий-мутаторов (см. рисунок), а также в линиях дикого типа у видов *B. subtilis*, *B. cenocepacia* и *V. fischeri*.

3. Асимметричное накопление мутаций G:C>A:T и A:T>G:C характерно как для основных, так и для вторичных хромосом, а также для межгенных участков основной хромосомы линий-мутаторов, что подтверждает мутационную природу данного явления.

4. Косинусное сходство полученных мутационных спектров показало, что мутационные спектры имеют высокую степень сходства у близкородственных видов, однако не способны в полной мере отразить степень филогенетического родства между различными кладами бактерий.

Выводы

Мы предполагаем, что обнаруженная асимметрия в мутационном спектре между лидирующей и отстающей цепями ДНК бактерий является причиной возникновения обнаруженного в бактериальных хромосомах GC-скоса [3], проявляющегося в обогащении лидирующей цепи по гуанину и тимину.

Литература

1. Mahilkar A. et al. Selection in a growing colony biases results of mutation accumulation experiments // Scientific Reports. 2022. No. 1 (12). P. 15470.

2. Sueoka N. Intrastrand parity rules of DNA base composition and usage biases of synonymous codons // Journal of Molecular Evolution. 1995. No. 3 (40). P. 318–325.

3. Lobry J. R. Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. // Molecular Biology and Evolution. 1996. No. 5 (13). P. 660–665.

4. Long H. et al. Background Mutational Features of the Radiation-Resistant Bacterium Deinococcus radiodurans // Molecular Biology and Evolution. 2015. No. 9 (32). P. 2383–2392.

5. Sung W. et al. Asymmetric Context-Dependent Mutation Patterns Revealed through Mutation–Accumulation Experiments // Molecular Biology and Evolution. 2015. No. 7 (32). P. 1672–1683.

6. Mutation Landscape of Base Substitutions, Duplications, and Deletions in the Representative Current Cholera Pandemic Strain | Genome Biology and Evolution | Oxford Academic. URL: https://academic.oup.com/gbe/article/10/8/2072/5061320 (access date: 18.07.2024).

7. Genome-Wide Biases in the Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in Vibrio cholerae and Vibrio fischeri | Molecular Biology and Evolution | Oxford Academic. URL: https://academic.oup.com/mbe/article/34/1/93/2649121?login=true (access date: 17.05.2024).

8. Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in the GC-Rich Multichromosome Genome of Burkholderia cenocepacia | Genetics | Oxford Academic. URL: https://academic.oup.com/genetics/article/200/3/935/5936246 (access date: 18.07.2024).

9. Rate and Spectrum of Spontaneous Mutations in Mycobacterium smegmatis, a Bacterium Naturally Devoid of the Postreplicative Mismatch Repair Pathway | G3 Genes|Genomes|Genetics | Oxford Academic. URL: https://academic.oup.com/g3journal/article/6/7/2157/6027717 (access date: 18.07.2024).

10. Dong M.-J., Luo H., Gao F. Ori-Finder 2022: A Comprehensive Web Server for Prediction and Analysis of Bacterial Replication Origins // Genomics, Proteomics & Bioinformatics. 2022. No. 6 (20). P. 1207–1213.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-13

МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ ПРОФИЛЯМИ АГРЕССИИ И ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ВАРИАЦИЯМИ BDNF, HTR2A И DRD4

AN APPROACH TO FIND LINKAGE BETWEEN AGGRESSION PROFILES AND GENETIC VARIATIONS OF BDNF, HTR2A AND DRD4

С. П. Байрамова

Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского, Москва

S. P. Bairamova

V. P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow

✉ bairamova23s@gmail.com

Аннотация

В исследованиях генетических факторов, лежащих в основе агрессивного поведения у людей, воспроизведение полученных ранее результатов часто оказывается затруднительным из-за гетерогенной природы агрессии. В результате данного исследования был предложен метод многомерного анализа психометрических и генетических данных, основанный на методах машинного обучения, позволяющий устанавливать профили агрессии и ассоциации генетических полиморфизмов с ними.

Abstract

In studies of genetic factors underlying aggressive behavior in humans, reproducing previously obtained results is often challenging due to the heterogeneous nature of aggression. As a result of this study, a method for the multidimensional analysis of psychometric and genetic data has been proposed. This method, based on machine learning techniques, enables the establishment of aggression profiles and the identification of associations with genetic polymorphisms.

В последние десятилетия множество исследований было посвящено изучению генетической предрасположенности человека к агрессивному поведению. Ген моноаминоксидазы А (MAOA) был достоверно ассоциирован с агрессивностью в разнообразных выборках. Однако влияние большинства генов-кандидатов остается спорным из-за гетерогенной природы агрессии. Многомерный анализ с использованием алгоритмов машинного обучения позволяет применять детализированные диагностические схемы в отношении причин агрессивного поведения.

Целью данного исследования была разработка метода дифференциации профилей агрессии среди участников выборки и выявления ассоциаций между полученными профилями и генетическими полиморфизмами BDNF, HTR2A и DRD4.

Агрессивность испытуемых оценивалась с помощью опросника Басса — Дарки, по характеристикам которого методами комбинаторики было сформировано более тысячи уникальных подпространств, в которых проводилась кластеризация методом К-средних. Все участники выборки до прохождения тест-опросника были предварительно разделены на 3 категории на основе вторичных признаков агрессивности. Для каждого участника были построены графики кластерного соседства, что позволило определить долю каждой категории испытуемых в полученных кластерах. Этот подход использовался для переразметки выборки и выделения новых категорий и профилей агрессии. Посредством анализа генотипов участников в новых категориях была выявлена уникальная связь между полиморфизмами и агрессивностью.

В результате исследования методом кластерного соседства были выделены профили агрессии, которые отличались от первоначальных профилей участников. Это показало, что психофенотипы, определенные по косвенным признакам, могут затруднять исследования генетических ассоциаций. Необходимо определять схожие группы испытуемых на основе психометрических данных, а затем присваивать им психофенотип. На базе алгоритмов кластеризации и методов комбинаторики был создан инструмент для психофенотипирования, который позволяет проводить профайлинг пациентов и определять их генетические особенности внутри новых групп.

Таким образом, были выделены профили агрессии, которые четко отражали характеристики участников. Это позволило установить ассоциации между генетическими вариациями и фенотипом.

© С. П. Байрамова, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-14

НА ШАГ БЛИЖЕ К ПАНГЕНОМУ: ПОИСК КРУПНОМАСШТАБНЫХ ИНТРОГРЕССИЙ В ГЕНОМАХ РОССИЙСКИХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ

TOWARD A PANGENOME: SEARCHING FOR LARGE-SCALE INTROGRESSIONS IN THE GENOMES OF RUSSIAN BREAD WHEAT VARIETIES, AND IDENTIFICATION OF PUTATIVE DONORS

А. В. Васильев[1], А. С. Ермолаев[1], Д. С. Ульянов[1], В. С. Воронежская[1,2], Н. М. Съедина[1], С. В. Тощаков[4], И. Ф. Лапочкина[3], М. Г. Дивашук[1,3]

[1] *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва*
[2] *Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, НИЦ «Курчатовский институт», Обнинск*
[3] *Федеральный исследовательский центр «Немчиновка», Москва*
[4] *Курчатовский геномный центр, НИЦ «Курчатовский институт», Москва*

A. V. Vasiliev[1], A. S. Ermolaev[1], D. S. Ulyanov[1], V. S. Voronezhskaya[1,2], N. M. Syedina[1], S. V. Toshchakov[4], I. F. Lapochkina[3], M. G. Divashuk[1,3]

[1] *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow*
[2] *All-Russia Research Institute of Radiology and Agroecology, National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*
[3] *Federal Research Center "Nemchinovka", Moscow*
[4] *Kurchatov Genomic Center, National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow*

✉ Va01007@mail.ru

Аннотация

В работе был проведен биоинформатический анализ коллекции образцов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) Арсенал для поиска крупных геномных перестроек и идентификации предполагаемого донора интрогрессий. Предполагаемый вид — источник интрогрессий был идентифицирован с помощью соревновательного картирования (competitive mapping) на синтетические аллополиплоидные сборки (САС), собранные из сборки генома мягкой пшеницы и предполагаемых доноров.

Abstract

A bioinformatic analysis of the bread wheat (*Triticum aestivum*) sample collection Arsenal was conducted to search for large genomic rearrangements and to identify the putative donor of the introgression. The presumed source species of the introgressions was identified using competitive mapping on synthetic allopolyploid assemblies (SAA) compiled from the bread wheat genome assembly and the presumed donors.

Поиск полезных интрогрессий в геноме мягкой пшеницы, полученных из дикой природы, — один из путей повышения генетического разнообразия для последующей селекции. Так как интрогрессии и инсерции приносят генетический материал из видов вторичного или третичного пула, они могут нести гены, критически важные для сельского хозяйства. Гибридизация мягкой пшеницы имеет ряд ограничений и часто невозможна со многими представителями своего семейства. Этот фактор делает поиск интрогрессий из других родов и видов ключевым способом внедрения новых ценных генов, наряду со скрещиванием через посредника. Гены, найденные в интрогрессиях, могут быть включены в пангеном мягкой пшеницы, так как были получены путем опыления с близкородственным организмом и последующей рекомбинации. В работе мы используем метод конкурентного картирования, который хорошо себя зарекомендовал и уже использовался в исследованиях, посвященных человеку, животным и метагеномике, но не применялся еще к растениям.

Материалы и методы. В работе были использован генетический материал, полученный генотипированием секвенированием (Genotyping-by-sequencing, GBS), выделенный из линий коллекции Арсенал. Коллекция была составлена из растений, которые скрещивали с представителями рода *Aegilops* (*Ae. speltoides, Ae. triuncialis*), а также с *T. kiharae* в качестве опылителей. В рамках работы нами был проведен углубленный поиск интрогрессий с использованием всех доступных в GenBank сборок геномов первичного, вторичного и третичного пулов генов

© А. В. Васильев, А. С. Ермолаев, Д. С. Ульянов, В. С. Воронежская, Н. М. Съедина, С. В. Тощаков, И. Ф. Лапочкина, М. Г. Дивашук, 2024

мягкой пшеницы, собранных до хромосом или выше [1]. Для того чтобы не только найти позиции интрогрессии, но и идентифицировать возможного донора, был использован подход соревновательного картирования (competitive mapping) [2]. Подход заключается в выравнивании генетического материала на CAC, составленную из геномов реципиента и предполагаемого донора. Таким образом, картирование ридов будет происходить на две сборки одновременно. Всего было использовано 19 CAC, состоящих из геномной сборки мягкой пшеницы (Chinese Spring v2.1) с видами — донорами H, U, G, S, A, V, E, R, D и C геномов. Результаты картирования позволили идентифицировать не только зону интрогрессии, но и предполагаемого донора (рис. 1). Преимуществом соревновательного картирования является более четкое определение границ коротких интрогрессий за счет картирования ридов с этих участков в более «подходящие» места на геноме-доноре (рис. 2). Так как программы

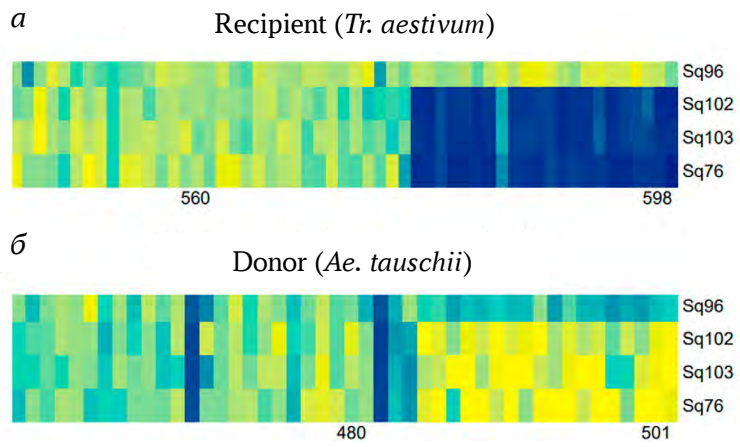


Рис. 1. Участок тепловой карты результатов картирования генетического материала на гибридную сборку *Triticum aestivum* и *Aegilops tauschii*: *а* — участок на реципиенте, *б* — участок на доноре

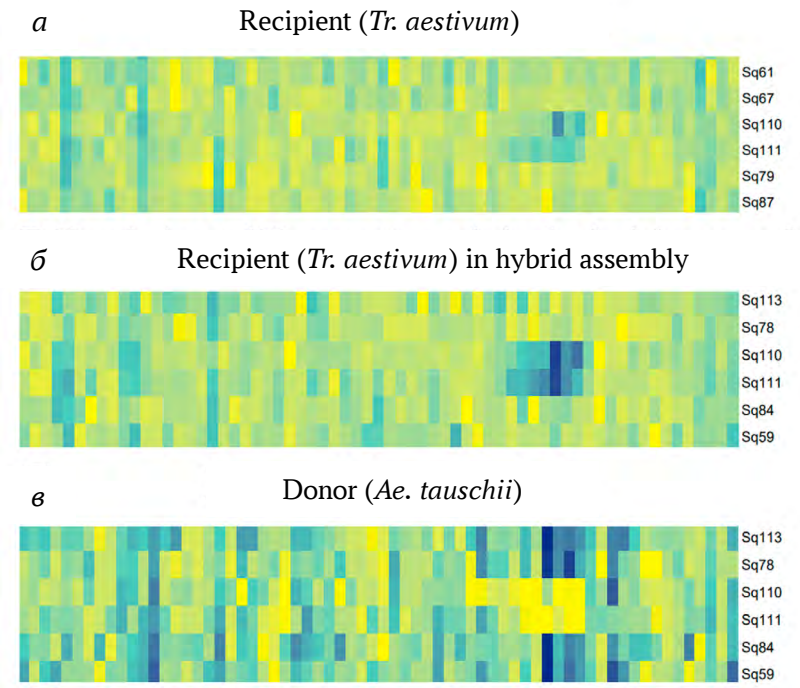


Рис. 2. Участок тепловой карты результатов картирования генетического материала на гибридную сборку *Triticum aestivum* и *Aegilops tauschii* и обычную сборку *Triticum aestivum: а* — участок мягкой пшеницы на обычной сборке, *б* — участок мягкой пшеницы на гибридной сборке, *в* — участок на доноре в составе гибридной сборки

для картирования коротких ридов на геномный референс настроены на выравнивании генетического материала с максимальным соответствием, то возможно определить участки, которые более специфично картируются на геном донора, чем на геном мягкой пшеницы. Такие участки будут характеризоваться повышенным покрытием на геноме-доноре и пониженным покрытием на геноме-реципиенте (см. рис. 2).

Для определения зон интрогрессий количество картированных ридов было посчитано в неперекрывающихся окнах генома размером 1 Mbp и нормализовано на общее количество картированных ридов с помощью скрипта на Python. Для визуализации результаты картирования были визуализированы в виде хитмапов, где была проведена дополнительная нормализация среди одинаковых окон (совпадающие хромосома и координаты) у разных образцов. Анализ тепловых карт с целью поиска интрогрессий, инсерций, дупликации и предполагаемых делеций проводился визуально.

Результаты. Анализ тепловых карт картирования генетического материала коллекции Арсенал на основе 19 CAC позволил обнаружить 5 инсерций, 13 дупликаций, 19 предполагаемых делеций и 126 интрогрессий. Размеры обнаруженных интрогрессий составляли от 3 до 802 Mbp (почти целая хромосома). На основании существующих аннотаций регион хромосомных перестроек был функционально аннотирован. По итогам работы гены, представленные в интрогрессиях и инсерциях, могут быть использованы в создании пангенома пшеницы мягкой пшеницы. Несмотря на простоту реализации, существенным недостатком данного метода является низкое разрешение, что позволяет находить только большие интрогрессии, а также для близкородственных геномов (например, для семейства S-геномов) невозможна однозначная идентификация вида-донора.

Литература

1. Keilwagen J., Lehnert, H., Berner, T. et al. Detecting major introgressions in wheat and their putative origins using coverage analysis // Sci Rep. 2022. Vol. 12. P. 1908.

2. Feuerborn T. R., Palkopoulou E., van der Valk T. et al. Competitive mapping allows for the identification and exclusion of human DNA contamination in ancient faunal genomic datasets // BMC Genomics. 2020. Vol. 21. P. 844.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-15

КЛАССИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГРУПП КУКУРУЗЫ НА ОСНОВЕ GENOTYPING-BY-SEQUENCING С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ WGS-ЯКОРЕЙ ИЗ ОТКРЫТОГО ДОСТУПА *

CLASSIFICATION OF MAJOR MAIZE HETEROTIC GROUPS BASED ON GENOTYPING-BY-SEQUENCING USING PUBLICLY AVAILABLE WGS REFERENCE SAMPLES

В. С. Воронежская[1,2], А. С. Ермолаев[1], Д. С. Ульянов[1], А. Р. Дмитриева[1], Н. М. Съедина[1], А. В. Васильев[1], Д. Ю. Сотченко[1,3], С. В. Тощаков[4]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, НИЦ «Курчатовский институт», Обнинск
[3]Всероссийский научно-исследовательский институт кукурузы, Пятигорск
[4]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

V. S. Voronezhskaya[1,2], A. S. Ermolaev[1], D. S. Ulyanov[1], A. R. Dmitrieva[1], N. M. Syedina[1], A. V. Vasiliev[1], D. Yu. Sotchenko[1,3], S. V. Toshchakov[4]

[1]All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow
[2]All-Russia Research Institute of Radiology and Agroecology, National Research Centre "Kurchatov Institute", Obninsk
[3]All-Russian Research Scientific Institute of Corn, Pyatigorsk
[4]National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow

✉ voronezhskaya.vs@gmail.com

Аннотация

Предложен способ классификации гетерозисных групп кукурузы на основе результатов генотипирования образцов с помощью GBS. Преимуществом метода является отсутствие необходимости секвенировать эталонные образцы гетерозисных групп, поскольку в качестве якорей используются WGS основных гетерозисных групп из открытых баз данных. Для стратификации образцов кукурузы российской селекции на гетерозисные группы был использован анализ главных компонент (PCA) и оценка родства по мультилокусному набору SNP.

Abstract

A method for classifying heterotic groups of maize based on genotyping results from GBS (Genotyping-by-Sequencing) is proposed. The advantage of this method is the lack of necessity to sequence reference samples of heterotic groups, as the anchors are derived from whole-genome sequencing (WGS) of major heterotic groups available in public databases. To stratify samples of Russian-bred maize into heterotic groups, principal component analysis (PCA) and assessment of relatedness using a multilocus SNP panel were employed.

Явление гетерозиса заключается в увеличении агрономически важных показателей гетерозиготных гибридов F_1 по сравнению с гомозиготными инбредными родителями. Кукуруза была одной из первых культур, для которых гетерозис был использован в селекционном процессе. В современной селекции кукурузы используется несколько основных гетерозисных групп. Гетерозисная группа — это коллекция различных генотипов, дающих схожие по характеристикам гибриды при скрещивании с особями противоположных различных групп для получения лучшего потомства. При скрещивании растений, относящихся к одной группе, создаются новые инбредные линии, а в результате скрещивания разных групп создаются высокопродуктивные гибриды.

Определение гетерозисных групп крайне важно для селекции кукурузы и требует создания точных маркеров. Ранее для определения гетерозисных групп кукурузы преимущественно использовались ПЦР-маркеры (SSR, RAPD, AFLP и др.), однако с развитием технологий секвенирования наиболее активно стали использоваться SNP-маркеры, поскольку их легче идентифицировать в большом количестве и они обладают более высокой разрешающей способностью [1, 2]. В литературе уже описано SNP-генотипирование кукурузы с использова-

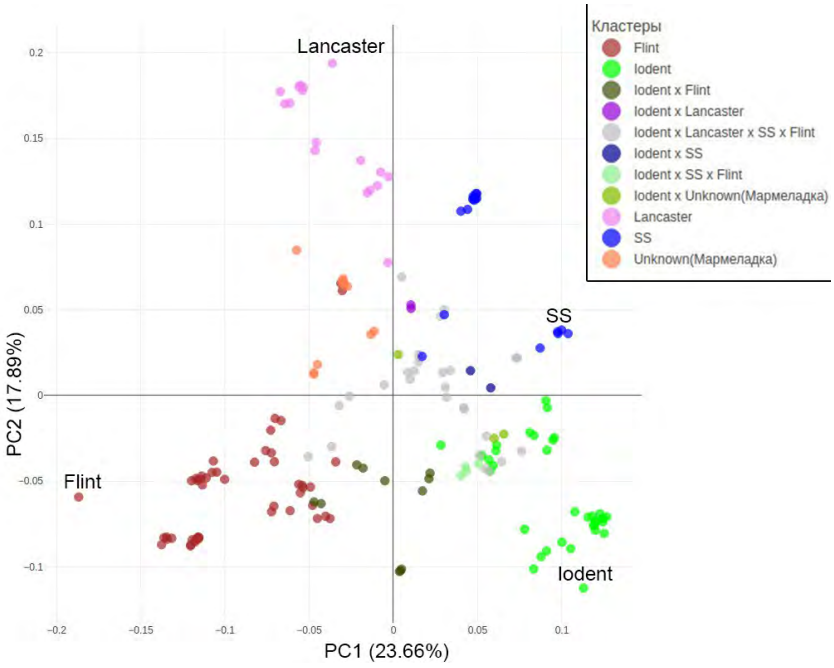
* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2019-1667).

© В. С. Воронежская, А. С. Ермолаев, Д. С. Ульянов, А. Р. Дмитриева, Н. М. Съедина, А. В. Васильев, Д. Ю. Сотченко, С. В. Тощаков, 2024

нием транскриптомного [3] и полногеномного секвенирования с высоким покрытием [4]. GBS (Genotyping-by-Sequencing) также применялся для американских и китайских сортов [5].

В нашей работе представлен метод классификации образцов кукурузы по гетерозисным группам с использованием данных GBS, основанный на кластеризации образцов с референсными геномными сборками основных инбредных линий — B73 (Stiff Stalk), PH207 (Iodent), Mo17 (Lancaster), EP1 (Flint). В результате первичного SNP-коллинга было проанализировано 174 образца и выявлено 833 955 уникальных SNP. Дополнительно был проведен SNP-коллинг четырех референсных образцов (23523985 SNP). Результаты первичного SNP-коллинга для GBS и WGS-якорей были объединены с использованием программы Bcftools 1.20 [6]. Для повышения точности кластеризации пропущенные генотипы были предсказаны на основании генотипированных гаплоблоков с помощью программы Beagle 5.4 [7]. Всего было выбрано 1247 дискриминирующих SNP на основе анализа неравновесия сцепления локусов (linkage disequilibrium). Кластеризация проводилась в программе ADMIXTURE на основе оценки максимального правдоподобия мультилокусных наборов [8]. Результаты кластеризации показали, что выделенные группы образцов хорошо коррелируют с известными гетерозисными группами, что подтверждает эффективность нашего метода (см. рисунок).

Таким образом, в нашей работе был применен ранее не описанный метод кластеризации образцов GBS-секвенирования с WGS основных гетерозисных групп. Одним из главных преимуществ данного подхода является отсутствие необходимости в секвенировании геномов известных гетерозисных групп, что значительно сокращает временные и ресурсные затраты. Этот подход не только снижает затраты на исследование, но и делает его более доступным в условиях отсутствия коллекции якорных линий. Разработанный нами оптимизированный подход актуален для селекционных программ кукурузы, направленных на создание новых гибридов с повышенной продуктивностью.



PCA-график кластеризации образцов кукурузы по гетерозисным группам

Литература

1. Frascaroli E., Schrag T.A., Melchinger A.E. Genetic diversity analysis of elite European maize (Zea mays L.) inbred lines using AFLP, SSR, and SNP markers reveals ascertainment bias for a subset of SNPs // TAG. Theoretical and applied genetics. 2013. No. 1 (126). P. 133–141.

2. Yuan L.X. et al. Comparison of genetic diversity among maize inbred lines based on RFLPs, SSRs, AFLPs and RAPDs // Yi Chuan Xue Bao = Acta Genetica Sinica. 2000. No. 8 (27). P. 725–733.

3. Mazaheri M. et al. Genome-wide association analysis of stalk biomass and anatomical traits in maize // BMC Plant Biology. 2019. No. (19). P. 45.

4. Bornowski N. et al. Genomic variation within the maize stiff-stalk heterotic germplasm pool // The Plant Genome. 2021. No. 3 (14). P. e20114.

5. Shu G. et al. Genetic variation and population structure in China summer maize germplasm // Scientific Reports. 2021. No. 1 (11). P. 8012.

6. Danecek P. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // GigaScience. 2021. No. 2 (10). P. giab008.

7. Browning B.L., Zhou Y., Browning S.R. A One-Penny Imputed Genome from Next-Generation Reference Panels // The American Journal of Human Genetics. 2018. No. 3 (103). P. 338–348.

8. Mazaheri M. et al. Genome-wide association analysis of stalk biomass and anatomical traits in maize // BMC Plant Biology. 2019. No. (19). P. 45.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-16

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ КЛАССИФИКАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКИХ ДАТЧИКОВ

DEVELOPMENT OF A MODEL FOR THE CLASSIFICATION OF PATHOLOGICAL CONDITIONS USING OPTICAL SENSORS

С. Н. Глебов[1], Ю. В. Лямина[1], М. С. Мазинг[1], А. С. Поляков[2], Я. А. Носков[2], А. Ю. Зайцева[1]

[1] *Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург*
[2] *Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург*

S. N. Glebov[1], J. V. Liamina[1], M. S. Mazing[1], A. S. Polyakov[2], Y. A. Noskov[2], A. Y. Zaitseva[1]

[1] *Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg*
[2] *S. M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg*

✉ stepangleboff@yandex.ru

Аннотация

Оптические датчики представляют собой перспективное направление для развития неинвазивных методов диагностики патологических состояний. Информация, получаемая с сенсоров, представляется в виде многомерного массива данных. Его особенностью является содержание большого количества скрытой информации, а также неявных взаимосвязей в данных, которые можно выделить, используя методы машинного обучения.

Abstract

Optical sensors represent a promising direction for the development of non-invasive diagnostic methods for pathological conditions. The information received from the sensors is presented as a multidimensional array of data. Its feature is the content of a large amount of hidden information, as well as implicit relationships in the data, which can be identified using machine learning methods.

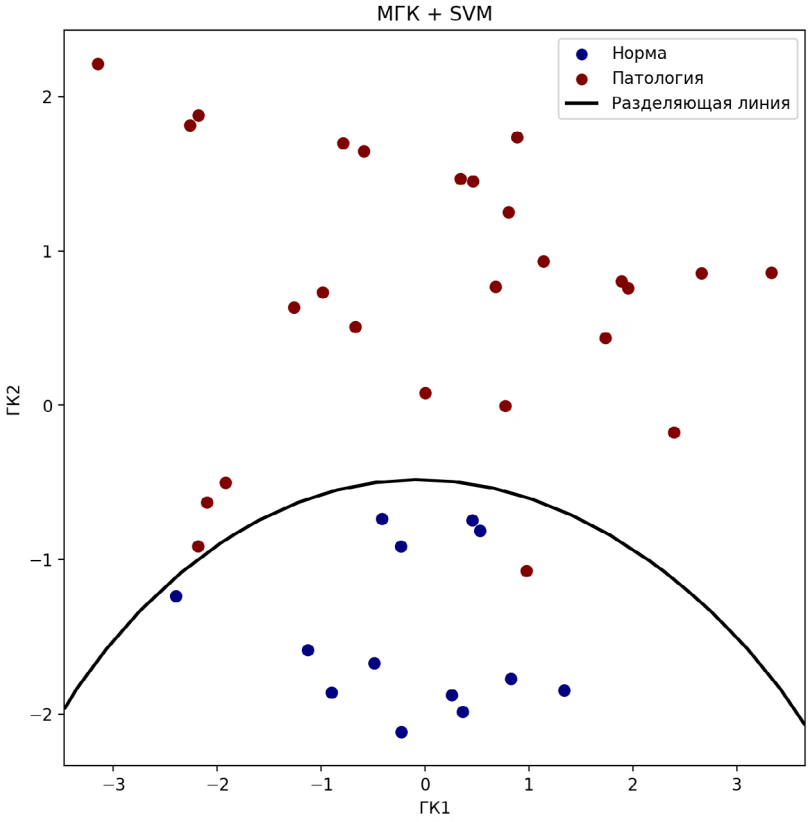
Диагностика патологических состояний является одной из ключевых задач современной медицины. Своевременное выявление заболеваний позволяет не только значительно повысить эффективность лечения, но и предотвратить развитие осложнений, улучшая качество жизни пациентов. Оптические датчики играют важную роль в медицине, предоставляя инструменты для диагностики различных заболеваний. Они позволяют проводить неинвазивные или минимально инвазивные измерения, что снижает риск для пациентов и улучшает качество медицинской помощи [1].

Данное исследование ставит перед собой задачу разделения нормального состояния от патологического при помощи разработанного в ИАП РАН оптического датчика, принцип работы которого основан на регистрации обратно рассеянного в тканях света. Он включает в себя два модуля — информационный и оптоэлектронный. Оптоэлектронный модуль представлен тремя источниками света и тремя датчиками света; каждый из датчиков фиксирует излучение на 6 различных узкополосных диапазонах длин волн. Таким образом, датчик способен регистрировать излучение на 18 различных длинах волн. Измерения снимались на предплечье испытуемых.

Собранные в ходе исследования экспериментальные данные представляли собой многомерный массив данных. Для его анализа были применены методы машинного обучения, такие как генетический алгоритм (GA), метод главных компонент (PCA), k-means кластеризация, метод опорных векторов (SVM). Для поиска оптимального набора волн, в пространстве которого в результате снижения размерности при помощи МГК образовывались бы два разделимых кластера, соответствующих состояниям нормы и патологии, был применен генетический алгоритм. Далее в найденном пространстве, после применения МГК, при помощи SVM строилась разделяющая линия (см. рисунок).

Результатом стала модель, достигающая разделения классов, соответствующих состояниям нормы и патологии. Проведенная кросс-валидация показала точность в более чем 85 %, что демонстрирует высокую устойчивость модели.

© С. Н. Глебов, Ю. В. Лямина, М. С. Мазинг, А. С. Поляков, Я. А. Носков, А. Ю. Зайцева, 2024



Два кластера, соответствующие нормальному (*синим*) и патологическому (*красным*) состояниям, разделенные линией, построенной при помощи SVM

Полученные результаты подтверждают перспективность использования данного подхода для неинвазивной диагностики патологических состояний. Дальнейшие исследования могут быть направлены на оптимизацию методики, увеличение объема данных для обучения моделей, применение более современных моделей машинного обучения, таких как нейронные сети и расширение области применения данной технологии в медицинской практике.

Литература

1. Vavrinsky E. et al. The current state of optical sensors in medical wearables // Biosensors. 2022. Vol. 12, No. 4. P. 217.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-17

ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ГЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR-CAS У АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ

SOFTWARE FOR IDENTIFYING OF POTENTIAL TARGETS OF CRISPR-CAS GENE EDITING IN ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA

А. В. Гоглев[1], Н. Д. Пастухова[2]

[1] *Тюменский государственный университет*
[2] *Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург*

A. V. Goglev[1], N. D. Pastuhova[2]

[1] *University of Tyumen*
[2] *Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg*

✉ alexey.goglev@gmail.com

Аннотация

Метод генного редактирования CRISPR-Cas может выступать одним из возможных методов преодоления антибиотикорезистентности бактерий. В исследовании нами было разработано программное обеспечение для поиска лучших целей генного редактирования на основе данных РНК-секвенирования штамма Klebsiella pneumoniae MGH66.

Abstract

The CRISPR-Cas gene editing method can be one of the possible ways to overcome bacterial antibiotic resistance. In this study, we developed a software to identify the best gene editing targets based on RNA sequencing data from the Klebsiella pneumoniae MGH66 strain.

В 2019 г. около 4,95 млн смертей было ассоциировано с антибиотикоустойчивыми бактериями, одной из ведущих по числу смертей от полирезистентных бактерий является *Klebsiella pneumoniae* [1].

Одним из возможных методов преодоления антибиотикорезистентности может быть редактирование генов устойчивости с помощью системы CRISPR-Cas. Система CRISPR-Cas представляет собой инструмент для генетической модификации организмов, основанный на механизмах иммунной защиты бактерий и архей от вирусов [2]. Однако правильное определение последовательности целевого гена является необходимой предпосылкой для эффективной работы системы CRISPR-Cas. Это обусловлено следующими факторами.

1. Если последовательность гена неверно определена, система может неправильно направить свои компоненты к ДНК, что может привести к нежелательным мутациям или к модификации неправильных участков генома [3].

2. Точное совпадение последовательности гена с РНК-матрицей, используемой системой CRISPR-Cas, значительно увеличивает вероятность успешной инактивации гена [4].

3. Офф-таргет эффекты, при которых система CRISPR-Cas наносит ущерб нецелевым участкам ДНК, могут быть минимизированы за счет точного определения последовательности целевого гена [3].

В нашей работе мы использовали данные РНК-секвенирования штамма Klebsiella pneumoniae MGH66 [5]. Данные представляли собой таблицу каунтов для 12 образцов, обработанных антибиотиками различных групп (меропенем, ципрофлоксацин и гентамицин). Оценку дифференциальной экспрессии генов провели с помощью библиотеки limma для языка программирования R. Для поиска нуклеотидной последовательности гена-мишени использовали референсную последовательность генома бактерии из базы данных RefSeq [6] и таблицу аннотированного генома (аннотация проводилась с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline) [7]. Для верификации полученной нуклеотидной последовательности использовали Nucleotide BLAST.

Мы провели оценку дифференциальной экспрессии генов, сравнивая контрольные образцы с теми, которые подвергались воздействию антибиотиков. В результате получили три таблицы с данными о up-регулированных генах в образцах под влиянием антибиотиков (см. таблицу). Всего up-регулируемых генов под влиянием меропенема — 5, ципрофлоксацина — 87, гентамицина — 134.

© А. В. Гоглев, Н. Д. Пастухова, 2024

Пример таблицы с up-регулируемыми генами при росте бактерий в среде ципрофлоксацина (представлено 3 гена из 87)

GeneID	Symbol	logFC	t	adj.P.Val
AF52_RS03005	mutS	5.00	9.09	0.00
AF52_RS03305	recA	4.67	7.35	0.01
AF52_RS05815	proS	3.00	4.22	0.04

Среди up-регулированных генов был ген recA, кодирующий рекомбиназу, которая участвует в SOS-ответе бактерии при воздействии ципрофлоксацина [8]. В дальнейшей работе целью для генного редактирования выступал recA.

Используя таблицу аннотированных генов, определили точное положение гена recA в референсной последовательности генома Klebsiella pneumoniae MGH66 и его нуклеотидную последовательность.

При верификации полученной нуклеотидной последовательности у бактерии штамма Klebsiella pneumoniae A16KP0119 была обнаружена идентичная последовательность, которая также кодирует ген recA.

Литература

1. Murray C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // The lancet. 2022. Vol. 399 (10325). P. 629–655.

2. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012. Vol. 337, No. 6096. P. 816–821.

3. Qin M. et al. CRISPR-Cas and CRISPR-based screening system for precise gene editing and targeted cancer therapy // Journal of Translational Medicine. 2024. Vol. 22 (1). P. 516.

4. Richardson C., Kelsh R. N., Richardson R. New advances in CRISPR/Cas-mediated precise gene-editing techniques // Disease Models & Mechanisms. 2023. Vol. 16 (2). P. 1–15.

5. NCBI. GEO DataSets: GSE180237. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE180237 (дата обращения: 17.07.2024).

6. NCBI. Genome Data: GCF_000694555.1. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000694555.1/ (дата обращения: 17.07.2024).

7. NCBI. Gene Data: GCF_000694555.1. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/gene/GCF_000694555.1/ (дата обращения: 17.07.2024).

8. Wang P. et al. Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin induce SOS response and mutations of antibiotic resistance in bacteria // Annals of microbiology. 2010. Vol. 60. P. 511–517.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-18

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ С НИЗКИМ УРОВНЕМ ДОСТОВЕРНОСТИ, НО ВНОСЯЩИХ ЗНАЧИМЫЙ ВКЛАД В ОТВЕТ НА ТЕПЛОВОЙ ШОК

IDENTIFICATION OF *DROSOPHILA MELANOGASTER* GENES THAT ARE DIFFERENTIALLY EXPRESSED WITH LOW CONFIDENCE BUT CONTRIBUTE MEANINGFULLY TO THE HEAT SHOCK RESPONSE

М. А. Дерюженко, Н. Е. Грунтенко

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

M. A. Deryuzhenko, M. G. Gruntenko

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk

✉ maksimd@bionet.nsc.ru

Аннотация

Потеря информации — это одна из ключевых проблем современного анализа транскриптомных данных. Одной из причин ее возникновения является отсечение данных по порогу достоверности. Частично эту проблему можно решить за счет увеличения выборки. Однако — только частично. В этой работе на примере метаанализа ответа на тепловой шок у *Drosophila melanogaster* показан новый подход к изучению генов, находящихся на разных уровнях достоверности.

Abstract

Information loss is one of the key problems of modern transcriptome data analysis. One of the reasons for its occurrence is data cutoff by confidence threshold. Partially, this problem can be solved by increasing the sample size. However, it is a partial solution. In this paper, a new approach to the study of genes at different confidence levels is demonstrated using a meta-analysis of the response to heat shock in *Drosophila melanogaster* as an example.

Потеря информации — это одна из ключевых проблем современного анализа транскриптомных данных. Одной из причин ее возникновения является отсечение данных по порогу достоверности. Делают это из-за влияния множества неучтенных факторов, возникающих при проведении и анализе результатов эксперимента, которые снижают общую достоверность полученных результатов. При таком подходе отбрасываются дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) с высоким значением коэффициента ложного обнаружения (FDR). При этом такие гены могут играть важную роль в контроле наблюдаемых изменений функций организма и получить высокие значения FDR ввиду низкой степени изменения экспрессии. Эту проблему можно решить несколькими способами:

1) увеличить достоверность результатов за счет увеличения размера выборки или числа исследований;

2) разработать или оптимизировать методы получения и анализа данных.

Оба варианта имеют свои преимущества и недостатки, но, применяя их одновременно, можно добиться хороших результатов. Таким комбинированным подходом является метаанализ. Однако при его проведении, как правило, также отсекаются гены, имеющие низкую достоверность. Из-за этого получаемые результаты не отображают все нюансы ответа на изучаемый фактор. Целью нашей работы является проведение метаанализа ответа на тепловой шок *Drosophila melanogaster* и изучение дифференциально экспрессирующихся генов, находящихся на разных уровнях достоверности.

Ранее на *Drosophila* было доказано наличие единого ответа на различные стрессовые факторы у насекомых и описан его нейрогормональный механизм, отличающийся высокой консервативностью [1, 2]. Нами была выбрана высокая температура как один из классических способов стрессорного воздействия на организм насекомого. Для уменьшения количества факторов, влияющих на результаты эксперимента, были выдвинуты следующие требования к данным для анализа: библиотеки получены из имаго *Drosophila melanogaster*, которые подвергались стрессовому воздействию в 37 °C в течение 5 мин, после чего были зафиксированы в жидком азоте.

В результате поиска транскриптомных экспериментов, посвященных тепловому шоку, было найдено всего три работы, две из которых удовлетворяли поставленному условию. При этом суммарное количество экспериментов равно трем. В отобранных экспериментах использовались целые самки, что также увеличило степень схоже-

© М. А. Дерюженко, Н. Е. Грунтенко, 2024

сти экспериментальных условий. Полученные данные были предобработаны с использованием утилиты FastQC и Trimmomatic. Выравнивание и квантификация проводились с использованием Hisat2 и featureCounts. Функциональная аннотация генов была проведена на основе баз данных NCBI, Ensembl, FlyBase и утилиты ShinyGO [3]. Реконструкция генной сети была сделана с использованием базы данных StringDB.

Ввиду низкого числа экспериментов было решено отказаться от использования формулы расчета весов, предлагаемой программой InterTransViewer [4], и сосредоточиться на дифференциально экспрессирующихся генах (ДЭГ) с разным уровнем достоверности. Были взяты гены с FDR < 0,95. Всего было найдено 7650 общих генов. Были выделены 4 основные группы генов: участвующие в процессах катаболизма липидов, укладки белков, регуляции трансляции в ответ на стресс и — неожиданно — реакции на холод. За счет функциональной аннотации выбранных генов, экспериментальной верификации и дополнительного анализа литературы удалось расширить существующую генную сеть ответа на тепловой стресс и подтвердить работоспособность предложенного метода.

Литература

1. Rauschenbach I. Y. et al. Stress-like reaction of Drosophila to adverse environmental factors // J. Comp. Physiol. B. Biochem. Syst. Environ. Physiol. 1987. Vol. 157 (4). P. 519–531.

2. Bobrovskikh M. A., Gruntenko N. E. Mechanisms of neuroendocrine stress response in drosophila and its effect on carbohydrate and lipid metabolism // Insects. 2023. Vol. 14 (5). P. 474.

3. Ge S. X., Jung D., Yao R. ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants // Bioinformatics. 2020. Vol. 36 (8). P. 2628–2629.

4. Tyapkin A. V., Lavrekha V. V., Ubogoeva E. V. et al. InterTransViewer: a comparative description of differential gene expression profiles from different experiments // Vavilov J. Genet. Breed. 2023. Vol. 27 (8). P. 1042–1052.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-19

ОЦЕНКА СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И СОСТАВА КЛАСТЕРОВ ГЕНОВ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА *STREPTOMYCES* *

EVALUATION OF THE SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS AND THE COMPOSITION OF SECONDARY METABOLISM GENE CLUSTERS IN A THERMOPHILIC STRAIN *STREPTOMYCES*

М. Е. Дмитриева, В. Н. Шелковникова, Н. А. Потапова, Д. В. Аксенов-Грибанов

Иркутский государственный университет

M. E. Dmitrieva, V. N. Shelkovnikova, N. A. Potapova, D. V. Axenov-Gribanov

Irkutsk State University

✉ marriee.dmitrieva@gmail.com

Аннотация

В рамках эксперимента был проведен скрининг вторичных метаболитов и оценка состава генных кластеров термофильного штамма *Streptomyces*. Выявлен синтез соединений, относящихся к семейству нокардаминов. Обнаружено 5 кластеров генов вторичного метаболизма, ответственных за синтез таких соединений, как геосмин, эктоин, нокардамин, курамицин и флавиолин.

Abstract

As part of the experiment, a screening of secondary metabolites and an assessment of the gene clusters composition of the thermophilic strain *Streptomyces* were conducted. The synthesis of compounds belonging to the nocardamine family was recorded. Five secondary metabolism gene clusters responsible for the synthesis of compounds such as geosmin, ectoine, nocardamine, kuramycine, and flaviolin were identified.

Микроорганизмы, выделенные из экстремальных экологических ниш, имеют ряд адаптаций к неблагоприятным условиям и низкую степень изученности. Это делает их высокоэффективными фабриками по производству новых природных соединений. Это приобретает особую значимость ввиду того, что большая часть лекарственных средств, используемых в настоящее время в качестве терапевтических средств, была получена из природных источников.

Целью данного исследования являлась оценка синтеза природных соединений и состава кластеров генов вторичного метаболизма у термофильного штамма *Streptomyces* LPB2020-019-1HS.

Штамм выделен из байкальской губки *Lubomirskia baikalensis* в результате нагрева при 110 °C в течение 2 ч. Далее штамм был культивирован при шести температурах (13, 28, 37, 45, 55 и 65 °C) в одиннадцати питательных средах, различных по составу. С использованием подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии была проведена оценка синтеза соединений штаммом *Streptomyces* при 13, 28 и 37 °C. Геном был секвенирован на платформе Illumina MiSeq. Полнота сборки была проверена с помощью BUSCO (v. 5.4.7) и набора данных streptomycetales_odb 10. Геном аннотирован с применением сервиса Prodigal (v. 2.6.3), функциональная аннотация выполнена с помощью eggNOG-mapper (v. 2.1.9). Потенциал штамма к синтезу вторичных метаболитов проанализирован с применением инструмента antiSMASH v.7. Кластеры с идентичностью более 80 % включены в анализ.

Согласно хромато-масс-спектрометрическому анализу, максимальное количество природных соединений было обнаружено при культивировании в среде SM27 (AC), pH — 4,5 при 28 °C и SM27 (Al), pH — 8,7 при 37 °C. Наименьшее количество природных соединений было обнаружено при культивировании в среде SM20 и R2 при 13 °C. Кроме того, при культивировании *Streptomyces* sp. LPB2020-019-1HS на питательной среде SM1 наблюдались минимальные различия в синтезе соединений при различных температурных условиях. Однако культивирование штамма на средах SM17, SM27(N) pH — 6,5, SM27(Al), R2 привело к индукции синтеза природных соединений при 37 °C.

* Исследование выполнено в рамках проекта Министерства науки и высшего образования РФ № FZZE-2024-0003, FZZE 2024-0011.

© М. Е. Дмитриева, В. Н. Шелковникова, Н. А. Потапова, Д. В. Аксенов-Грибанов, 2024

Также было отмечено, что *Streptomyces* sp. LPB2020-019-1HS синтезирует природные соединения, относящиеся к семейству нокардаминов. Выявлен синтез таких соединений, как нокардамин, деметиленокардамин, деоксинокардамин и ферриоксамин D2. Все соединения были обнаружены при температуре 28 °C в средах SM17, SM25, SM27(N) pH — 6,5, R2 и 37 °C в средах SM17, SM12, SM24, SM25, SM27 (AC) pH — 4,5, SM27(N) pH — 6,5, SM27(Al) pH — 8,7, R2. Согласно базе данных Dictionary of Natural Products (CRC-press. v.10.1 2019), данные соединения являются антиоксидантами и сидерофорами.

В ходе исследования было собрано 95 % генома. Штамм идентифицирован как вид *Streptomyces thermodiastaticus*. Обнаружено 5 кластеров генов вторичного метаболизма с идентичностью более 80 % и 14 кластеров с меньшей идентичностью.

В ходе работ обнаружен кластер поликетидсинтазы III типа, ответственный за синтез таких соединений, как флавиолин и 1,3,6,8-тетрагидроксинафталин. Флавиолин является продуктом спонтанного окисления 1,3,6,8-тетрагидроксинафталина, который синтезируется бактериями. Также был обнаружен кластер поликетидсинтазы II типа, ответственный за синтез курамицина. Курамицин является антибиотиком с поликетидным каркасом, состоящим из модифицированной орселлиновой кислоты. Кластер терпенов, ответственных за синтез геосмина, также был обнаружен в геноме термофильного штамма. Геосмин является широко известным метаболитом, обусловливающим земельный запах. Также выявлен кластер, ответственный за синтез десферриоксамина E, также известного как нокардамин. Ранее нами показано, что штамм синтезировал данное соединение при температурах 28 и 37 °C и не синтезировал при температуре 13 °C. Данная молекула является широко распространенным метаболитом для бактерий рода *Streptomyces*. Более того, десферриоксамин E играет большую роль непосредственно для бактерий данного рода, а именно стимулирует их рост, дифференцировку клеток и индуцирует синтез антибиотиков.

Таким образом, результаты исследования подчеркивают важность изучения экстремофильных микроорганизмов из озера Байкал для разработки новых фармацевтических препаратов и биотехнологических решений для решения задач современного здравоохранения.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-20

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA* НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ*

ANALYSIS OF THE GENETIC STRUCTURE OF THE HONEY BEE *APIS MELLIFERA* ON THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF BELARUS

О. И. Добыш, А. И. Царь

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

O. I. Dobysh, A. I. Tsar

Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk

✉ o.dobysh@igc.by, a.tsar@igc.by

Аннотация

Для точной идентификации медоносных пчел, принадлежащих к разным эволюционным ветвям, создана референсная выборка на основе анализа микросателлитных маркеров и статистической обработки данных.

Abstract

To accurately identify honey bees belonging to different evolutionary branches, a reference sample was created based on the analysis of microsatellite markers and statistical data processing.

Использование референсной выборки позволяет улучшить точность молекулярно-генетического анализа для установления принадлежности исследуемого объекта.

Объектом исследований служили рабочие пчелы *Apis mellifera*. Выделение ДНК проводили из торакса с помощью коммерческого набора «ДНК-Экстран-2». Анализ полиморфизма микросателлитных повторов ДНК проводили с использованием ПЦР с флуоресцентно-мечеными праймерами [1]. При наличии продукта реакции фрагменты разделяли на приборе ABI3500 Genetic Analyzer. Кластерный анализ проведен программой STRUCTURE 2.3.4 [2]. Количество кластеров (K) находилось в диапазоне от 1 до 10. Для визуализации результатов, их математического подтверждения методами Evanno [3] использована веб-программа STRUCTURE Harvester. По результатам анализа количество кластеров равно четырем (K = 4). Для каждой из исследованных особей в выборке определили вероятность ее принадлежности к какому-либо из предложенных кластеров. Чтобы получить референсную выборку пчел, из анализа исключались все образцы с долей принадлежности к какому-либо кластеру меньше 0,8. Повторно проводился кластерный анализ в программе STRUCTURE 2.3.4 (см. рисунок).

Так как кластерный анализ показал, что все исследованные образцы пчел разделились на 4 кластера, можно предположить наличие четырех генетических популяций пчел в анализируемой коллекции.

Показатели ожидаемой (He) и наблюдаемой (Ho) гетерозиготности, а также их стандартные отклонения (SD) рассчитаны при помощи программы Microsatellite Toolkit и представлены в табл. 1. Значение He и Ho схожи, что говорит о том, что система случайного скрещивания преобладает над инбридингом.

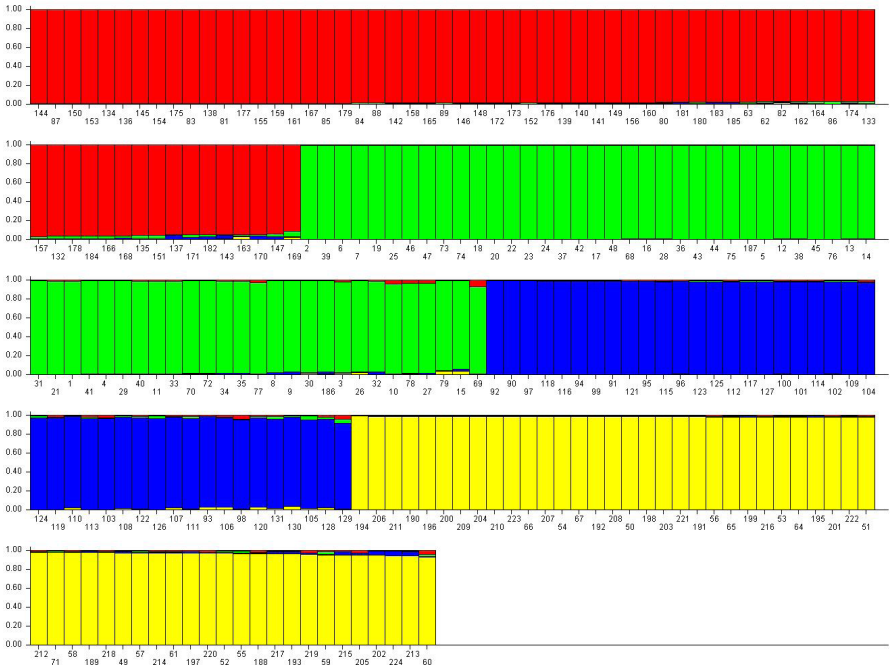
Таблица 1

Показатели ожидаемой (He) и наблюдаемой (Ho) гетерозиготности, их стандартные отклонения (SD) в популяциях

Популяция	He	He SD	Ho	Ho SD
Зеленая	0,6782	0,0518	0,6352	0,0218
Желтая	0,7518	0,0386	0,5428	0,0286
Красная	0,7062	0,0514	0,7232	0,0211
Синяя	0,8677	0,0106	0,9360	0,0132

* Исследование выполнено в рамках НИР «Изучение генетического разнообразия популяции аборигенных животных Беларуси».

© О. И. Добыш, А. И. Царь, 2024



Структура распределения генотипов медоносной пчелы *Apis mellifera* на территории Республики Беларусь (K = 4)

Уровни генетической структуры популяции вычисляли на основе R-статистики Райта. Филогенетические отношения установлены путем расчета парных генетических расстояний Nei [4] с использованием GenAlEx 6.5 [5]. Для уточнения влияния различных факторов на генетическую структуру популяции использовали дополнительные генетические характеристики — коэффициенты инбридинга Райта, по величине которых судили об уровне дифференциации популяций и соотношении процессов интеграции и дезинтеграции на внутри- и межпопуляционном уровнях (табл. 2).

Таблица 2

Значение индексов F-статистики Райта для полиморфных локусов всех исследованных популяций пчел

Локус	Fis	Fit	Fst	Nm
HB-C16-05	0,110	0,226	0,130	1,667
HB-C16-01	0,032	0,111	0,081	2,823
HB-THE-03	0,162	0,261	0,118	1,865
A88	0,222	0,335	0,146	1,466
A113	–0,120	0,029	0,134	1,622
AP043	0,043	0,110	0,069	3,352
A24	0,009	0,172	0,165	1,269
A28a	–0,108	0,004	0,101	2,234

Низкие значения Fis и Fit в популяциях говорят о состоянии, близком к равновесному. Низкие значения Fst показывают, что популяции свободно скрещиваются, отсутствует тенденция к генетической изоляции. Так как Nm принимает значение больше 1, то в популяциях присутствует высокий уровень общих генов, что предотвращает генетическую дифференциацию между популяциями, вызванную дрейфом генов.

Использованный нами подход позволил создать референсную выборку, которую можно использовать в дальнейших исследованиях для точного установления эволюционной принадлежности образцов пчел.

Литература

1. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1973. Vol. 70, No. 12. P. 3321–3323.

2. Earl D.A. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genetics Resources. 2012. Vol. 4, No. 2. P. 359–361.

3. Evanno G. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // Mol. Ecol. 2005. Vol. 14, No. 8. P. 2611–2620.

4. Peakall R., Smouse P. E.GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research — an update // Bioinformatics. 2012. Vol. 28, No. 19. P. 2537–2539.

5. Pritchard J. K. et al. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. Vol. 155, No. 2. P. 945–959.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-21

МОДИФИКАЦИЯ МОДЕЛИ ПОПУЛЯЦИИ МИКРОБНОЙ КУЛЬТУРЫ С УЧЕТОМ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА И ФАКТОРА АДАПТАЦИИ *

MODIFICATION OF THE POPULATION MODEL WITH METABOLIC PRODUCTS AND ADAPTATION FACTOR

Я. Д. Дунаев[1], И. О. Стародумов[1], П. В. Микушин[1,2], К. Е. Махаева[1], И. Г. Низовцева[1]

[1] *Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург*
[2] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

Y. D. Dunaev[1], I. O. Starodumov[1], P. V. Mikushin[1,2], K. E. Makhaeva[1], I. G. Nizovtseva[1]

[1] *Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ ksenia.makhaeva@urfu.ru

Аннотация

В настоящей работе сформулирована математическая модель динамики популяции микробной культуры в проточном биореакторе, учитывающая связь скорости роста бактерий с продуктами метаболизма и временем адаптации бактерий к среде. По результатам численного моделирования обнаружено, что в зависимости от времени адаптации и длительности лаг-фазы динамика популяции бактерий существенно меняется.

Abstract

In the present work a mathematical model of the population in a flow-through bioreactor is formulated, taking into account the influence of bacterial growth rate of metabolic products and bacterial adaptation time to the environment. Based on the results of numerical modeling, it was found that the growth rate of the bacterial population significantly depends on the adaptation time and the lag phase duration.

Понимание взаимосвязи между динамикой популяции бактерий и свойствами окружающей среды необходимо для разработки благоприятных условий культивирования, обеспечивающих наилучшую производительность биореактора. В связи с этим все большее значение приобретают исследования по кинетике микробиологических процессов [1].

Целью данной работы является построение математической модели популяционной динамики микробной культуры с учетом влияния на скорость роста бактерий продуктов метаболизма и времени адаптации. В дальнейшем сформулированная модель может использоваться для предсказания длительности фаз роста популяции бактерий в проточном биореакторе, а также для анализа системы на устойчивость.

Для описания непрерывного процесса ферментации микроорганизмов в проточном биореакторе рассмотрим в качестве основы систему уравнений, ранее представленную в монографии [2].

Исходную систему можно расширить за счет использования модели Иерусалимского [3], которая обеспечивает учет влияния продуктов метаболизма на удельную скорость роста популяции культуры.

Известно, что при попадании популяции бактерий в среду богатую питательными веществами клетки в течение некоторого промежутка времени (лаг-фаза) адаптируются к условиям. Для учета данного явления исходная модель [2] может быть модифицирована учетом множителя $\frac{t}{a+t}$, который описывает время адаптации, в течение которого клетки приспосабливаются к новым условиям [4]. В результате полученная модифицированная модель может быть записана следующим образом:

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-11-00351).

© Я. Д. Дунаев, И. О. Стародумов, П. В. Микушин, К. Е. Махаева, И. Г. Низовцева, 2024

$$\begin{cases} \dfrac{dX}{dt} = \dfrac{м_m S_{O_2} S_{CH_4}}{\left(k_{O_2} + S_{O_2}\right)\left(k_{CH_4} + S_{CH_4}\right)} \dfrac{k_P}{k_P + P} \dfrac{t}{a+t} X - DX \\ \dfrac{dS_{O_2}}{dt} = k_L a_1 \left(S^*_{O_2} - S_{O_2}\right) - б_{O_2} \dfrac{м_m S_{O_2} S_{CH_4}}{\left(k_{O_2} + S_{O_2}\right)\left(k_{CH_4} + S_{CH_4}\right)} \dfrac{k_P}{k_P + P} \dfrac{t}{a+t} X - DS_{O_2} \\ \dfrac{dS_{CH_4}}{dt} = k_L a_2 \left(S^*_{CH_4} - S_{CH_4}\right) - б_{CH_4} \dfrac{м_m S_{O_2} S_{CH_4}}{\left(k_{O_2} + S_{O_2}\right)\left(k_{CH_4} + S_{CH_4}\right)} \dfrac{k_P}{k_P + P} \dfrac{t}{a+t} X - DS_{CH_4} \\ \dfrac{dP}{dt} = нX - DP \end{cases}$$

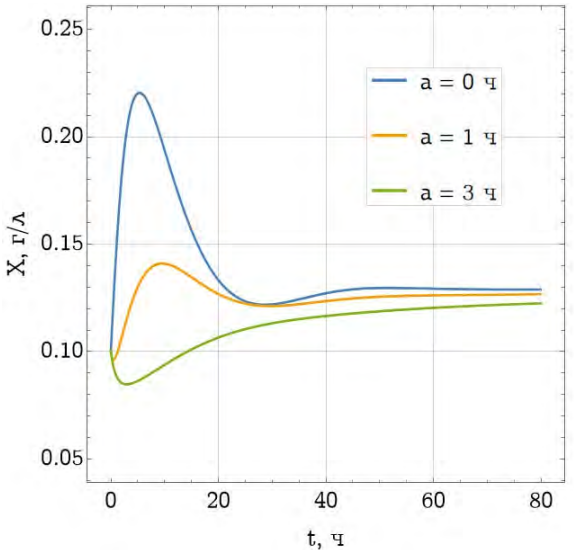


График зависимости концентрации микробной культуры от времени культивации при следующих параметрах системы: $\mu_m = 0{,}8$ ч$^{-1}$, $S^*_{O_2} = 0{,}007$ г/л, $S^*_{CH_4} = 0{,}015$ г/л, $k_{O_2} = k_{CH_4} = k_P = 0{,}0005$ г/л, $k_L a_1 = k_L a_2 = 100$ ч$^{-1}$, $\alpha_{O_2} = 3$, $\alpha_{CH_4} = 2{,}1964$, $\nu = 0{,}001$, $D = 0{,}2$ ч$^{-1}$

Здесь X — концентрация бактерий, μ_m — максимальная скорость роста бактерий, S_{O_2}, S_{CH_4} — концентрации растворенного кислорода и метана, k_{O_2}, k_{CH_4} — константы, численно равные концентрации субстрата, при которой скорость роста культуры равна половине максимальной, k_P — константа, численно равная концентрации метаболита, при которой скорость роста культуры равна половине максимальной, P — концентрация продуктов метаболизма, a — время адаптации, D — скорость протока, $k_L a_1$, $k_L a_2$ — объемные коэффициенты массопередачи по кислороду и метану соответственно, α_{O_2}, α_{CH_4} — расходные коэффициенты, $S^*_{O_2}$, $S^*_{CH_4}$ — равновесные концентрации, ν — коэффициент, описывающий интенсивность образования продуктов метаболизма.

По результатам численных расчетов получен график (см. рисунок) динамики популяции при разном времени адаптации бактерий к среде. Видно, что в зависимости от параметра a значительно меняется кривая концентрации биоты в системе.

В начальные моменты времени происходит кратковременное снижение концентрации бактерий. Далее, в зависимости от величины a, возможны несколько случаев. При малых a наблюдается резкий рост концентрации бактерий, а затем спад, вызванный накоплением продуктов метаболизма, ингибирующих рост бактерий. В случае больших a, после кратковременной фазы вымирания, наблюдается монотонный рост популяции к положению равновесия. При достаточно большом времени жизни система достигает устойчивого положения равновесия вне зависимости от времени адаптации.

Литература

1. Formenti L. R. et. al. Challenges in industrial fermentation technology research // Biotechnology Journal. 2014. Vol. 9. P. 727–738.

2. Кафаров В. В., Винаров А. Ю., Гордеев Л. С. Моделирование биохимических реакторов. М.: Лесная промышленность, 1979. С. 344.

3. Иерусалимский Н. Д. Биохимические основы регуляции скорости роста микроорганизмов // Изв. АН СССР, сер. биол. 1967. С. 339–350.

4. Baranyi J., Roberts T. A., McClure P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth // Food microbiology. 1993. Vol. 10. P. 43–59.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-22

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И АНАЛИЗА SNP У 74 ПАЦИЕНТОВ

GENETIC DETERMINANTS OF PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION: RESULTS OF WHOLE GENOME SEQUENCING AND SNP ANALYSIS IN 74 PATIENTS

В. И. Замятин[1], Г. С. Охрименко[1], И. И. Боровикова[2], Е. В. Зобова[3], Д. А. Никулин[3], Е. Н. Данковцева[3,4], Д. А. Затейщиков[3,4], М. С. Попцова[1]

[1]Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва
[2]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
[3]Центральная государственная медицинская академия УД Президента РФ, Москва
[4]Городская клиническая больница № 29 им. Н. Э. Баумана, Москва

V. I. Zamyatin[1], G. S. Okhrimenko[1], I. I. Borovikova[2], E. V. Zobova[3], D. A. Nikulin[3], E. N. Dankovtseva[3,4], D. A. Zateyshchikov[3,4], M. S. Poptsova[1]

[1]National Research University Higher School of Economics, Moscow
[2]Lomonosov Moscow State University
[3]Central State Medical Academy of the Presidential Administration of the Russian Federation, Moscow
[4]City Clinical Hospital No. 29 named after N. E. Bauman, Moscow

✉ vzamyatin@hse.ru

Аннотация

В исследовании проведено WGS у 74 пациентов с ЛАГ с использованием платформы MGI DNBSEQ. Для анализа использовались инструменты bwa-mem, MarkDuplicates, GATK HaplotypeCaller и VEP с dbNSFP и SpliceAI. Выявлены 6 известных (5 патогенных, 1 вероятно патогенный) и 1 *de novo* (вероятно патогенный) SNP. Выявленные SNP создают стоп-сигналы или изменяют сплайсинг гена BMPR2, что связано с патогенезом ЛАГ.

Abstract

The study performed WGS in 74 patients with PAH using the MGI DNBSEQ platform. The bwa-mem, MarkDuplicates, GATK HaplotypeCaller and VEP tools with dbNSFP and SpliceAI were used for analysis. Six known (5 pathogenic, 1 likely pathogenic) and 1 *de novo* (likely pathogenic) SNPs were identified. The identified SNPs create stop signals or alter splicing of the BMPR2 gene, which is associated with the pathogenesis of PAH.

Введение и цель. Легочная артериальная гипертензия (ЛАГ) представляет собой серьезное и прогрессирующее заболевание, характеризующееся повышением давления в легочных артериях, что приводит к правожелудочковой недостаточности и высокой смертности. Несмотря на значительные достижения в понимании патофизиологических механизмов ЛАГ, остаются вопросы о генетических факторах, влияющих на развитие и прогрессирование данного заболевания. Современные методы молекулярной генетики, такие как полногеномное секвенирование (WGS) и анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP calling), предоставляют уникальные возможности для выявления генетических вариантов, ассоциированных с ЛАГ, и оценки их патогенности.

Целью данного исследования является проведение полногеномного секвенирования и анализа однонуклеотидных полиморфизмов у пациентов с легочной артериальной гипертензией для выявления потенциально патогенных генетических вариантов и оценки их роли в патогенезе заболевания.

Методы. *Популяция исследования*. В исследование включено 74 пациента с диагнозом «легочная артериальная гипертензия» (ЛАГ). Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании и предоставление образцов для генетического анализа.

Полногеномное секвенирование. Для проведения полногеномного секвенирования (WGS) использовалась платформа MGI DNBSEQ. Процедура включала экстракцию ДНК из периферической крови пациентов, подготовку библиотек и проведение секвенирования с покрытием, обеспечивающим высокую точность и полноту данных.

© В. И. Замятин, Г. С. Охрименко, И. И. Боровикова, Е. В. Зобова, Д. А. Никулин, Е. Н. Данковцева, Д. А. Затейщиков, М. С. Попцова, 2024

Анализ данных. Выравнивание и предобработка данных**:** сырые данные секвенирования выравнивались на референсный геном человека (GRCh38) с использованием инструмента bwa-mem; для удаления дубликатов прочтений применялся инструмент MarkDuplicates из пакета GATK. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP calling) выполнялся с использованием GATK HaplotypeCaller; патогенность выявленных вариантов оценивалась с помощью аннотационного инструмента VEP (Variant Effect Predictor) с использованием баз данных dbNSFP и SpliceAI; классификация патогенности вариантов проводилась в соответствии с рекомендациями ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) с помощью InterVar. Анализ структурных вариаций (SV): выявление структурных вариаций проводилось с использованием инструмента Gridss; оценка патогенности структурных вариаций выполнялась с помощью CADD-SV (Combined Annotation-Dependent Depletion for Structural Variants).

Результаты. В результате биоинформатического варианта были найдены 6 (5 патогенных, 1 вероятно патогенный по ACMG) известных SNP и 1 (вероятно патогенный по ACMG) рассматриваемый нами *de novo* (табл. 1).

Таблица 1

Патогенные и вероятно патогенные варианты, обнаруженные у пациентов с ЛАГ

Chr	Pos	Ref	Alt	Consequence	Gene	Databases	Patient count	ACMG
2	202532663	C	T	stop_gained	BMPR2	rs946132834&CM023609&COSV65810324	1	Pathogenic
2	202530820	C	T	stop_gained	BMPR2	rs137852751&CM010163&COSV65808047	1	Pathogenic
2	202520195	C	T	stop_gained	BMPR2	rs1060502581&CD1513986&CM043449&COSV65807609	1	Pathogenic
2	202467648	A	G	Missense variant	BMPR2	rs863223426&CM106873&COSV101001618	2	Likely pathogenic
17	61482932	C	T	stop_gained	TBX4	rs1603256040&COSV53610400	1	Pathogenic
15	40032178	C	T	stop_gained	EIF2AK4	rs372637398&COSV99139556	1	Pathogenic
7	30922075	G	T	Missense variant	AQP1		1	Likely pathogenic

Варианты *rs946132834, rs137852751, rs1060502581* создают преждевременный трансляционный стоп-сигнал, они обнаружены у людей с семейной первичной легочной гипертензией (PMID: 12139571). Известно, что варианты с потерей функции в BMPR2 являются патогенными (PMID: 16429395, 11015450, 30578397). *rs863223426* — это миссенс-вариант, наблюдался у лиц с легочной артериальной гипертензией (PMID: 19555857, 20534176, 21737554, 29843651, 31727138, 32581362). Он заменяет аспарагин, который является нейтральным и полярным, на аналогичный серин, в кодоне 126 белка BMPR2 (p.Asn126Ser). В настоящее время данные указывают на то, что вариант является патогенным, но для окончательного доказательства этого необходимы дополнительные данные. Вариант *p.G132C (chr7:30922075 G> T)* соответствует критериям ACMG: PM1, PM2, PP2, PP3, вследствие чего обозначен как вероятно патогенный.

Вариант rs75747031 (g.202533253A>G) присутствует у 4 пациентов (табл. 2) и с высокой вероятностью изменяет процесс сплайсинга в гене BMPR2 — создает новый акцепторный сайт, а значит, может являться патогенным.

Таблица 2

Сплайс-вариант, обнаруженный у 4 пациентов с ЛАГ

Chr	Pos	Ref	Alt	Databases	Gene	SpliceAI acceptor gain score	Patient count
chr2	202533253	A	G	rs75747031	BMPR2	0.57	4

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-23

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПСЕВДОГЕНА ENSG00000186076

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE PSEUDOGENE ENSG00000186076

М. А. Зыкова[1], И. А. Поттер[1], А. А. Макашов[2]

[1]Школа № 225, Санкт-Петербург
[2]Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

M. A. Zykova[1], I. A. Potter[1], A. A. Makashov[2]

[1]Secondary school No. 225, Saint Petersburg
[2]Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University

✉ mashkazykova@yandex.ru

Аннотация

В работе был проведен филогенетический анализ псевдогена ENSG00000186076 и анализ его экспрессии в нормальных и опухолевых тканях. Ортологи данного гена были обнаружены только у приматов. Экспрессия гена повышена при карциноме пищевода, глиобластоме, почечной прозрачно-клеточной карциноме, плоскоклеточной карциноме легкого, серозной цистаденокарциноме яичников и аденокарциноме желудка.

Abstract

In this work we performed phylogenetic analysis of the pseudogene ENSG00000186076 and analysis of its expression in normal and tumor tissues. Orthologs of this gene were found only in primates. Gene expression is upregulated in esophageal carcinoma, glioblastoma, renal clear cell carcinoma, squamous cell carcinoma of the lung, serous ovarian cystadenocarcinoma, and gastric adenocarcinoma.

В данной работе мы провели филогенетический анализ некодирующего гена ENSG00000186076. Данный ген расположен на хромосоме 12 и является процессированным псевдогеном гена PGAM1. Экспрессия гена ENSG00000186076 значительно снижена у пациентов с тяжелой формой COVID-19 [1], что свидетельствует о связи уровня его экспрессии с тяжестью заболевания.

Поиск гомологов был проведен в 15 геномах видов, относящихся к роду человека. В геноме человека выявлено 15 процессированных псевдогенов с высокой степенью сходства с последовательностью ENSG00000186076. Гомологи этого гена найдены только у приматов, причем наиболее значительная псевдогенизация гена PGAM1 наблюдалась у Catarrhini.

Мы также обнаружили, что экспрессия ENSG00000186076 повышена при карциноме пищевода, глиобластоме, почечно-клеточной карциноме, плоскоклеточной карциноме легкого, серозной цистаденокарциноме яичников и аденокарциноме желудка. Наибольший уровень экспрессии наблюдался в глиобластоме.

Литература

1. Bibert S, Guex N, Lourenco J. et al. Transcriptomic Signature Differences Between SARS-CoV-2 and Influenza Virus Infected Patients // Front Immunol. 2021. Vol. 12. P. 666163.

© М. А. Зыкова, И. А. Поттер, А. А. Макашов, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-24

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНВАЗИВНЫХ И НЕИНВАЗИВНЫХ ДАННЫХ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

INVASIVE AND NON-INVASIVE DATA FOR MACHINE LEARNING BASED DIAGNOSIS OF DIABETES MELLITUS

И. А. Корзун[1], К. С. Егоров[2]

[1]*Московский физико-технический институт*
[2]*Лаборатория искусственного интеллекта Sber AI Lab, Москва*

I. A. Korzun[1], K. S. Egorov[2]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology*
[2]*Sber AI Lab, Moscow*

✉ ivan.korzun@gmail.com

Аннотация

В настоящей работе проведено сравнение предиктивной значимости данных анамнеза, результатов лабораторных анализов и записей ЭКГ, а также их сочетанного применения при диагностике сахарного диабета методами машинного обучения.

Abstract

The present work compares the predictive value of medical history data, laboratory test results and ECG recordings, as well as their combined use in diagnosis of diabetes mellitus by machine learning methods.

Введение. Сахарный диабет (СД) является одним из наиболее распространенных и клинически значимых заболеваний. По прогнозам, к 2035 г. более чем у 590 млн пациентов будет данное заболевание [1]. Серьезной проблемой является несвоевременная диагностика СД. В 2021 г. почти каждый второй взрослый с СД не был осведомлен о своем диабетическом статусе [2]. Существующие сейчас модели машинного обучения для диагностики СД 2-го типа в большинстве случаев унимодальные [3] и/или используют результаты инвазивных исследований [4], что ограничивает их применение для скрининга. Перспективна разработка мультимодальной модели на основе данных анамнеза и результатов ЭКГ как простого и доступного для скрининга метода.

Цель. Настоящая работа призвана сравнить предиктивную значимость отдельных групп признаков при диагностике СД при использовании различных методов машинного обучения.

Материалы и методы. Была использована общедоступная база данных MIMIC-IV с данными электронных медицинских карт о более чем 160 000 пациентов, получавших терапию в Beth Israel Deaconess Medical Center с 2008 по 2019 г. [5]. Были выбраны данные анамнеза (пол, возраст, рост, вес, индекс массы тела, расовая принадлежность, систолическое и диастолическое артериальное давление), инвазивных исследований (гликированный гемоглобин, глюкоза, С-реактивный белок, липопротеины высокой плотности (ЛПВП), липопротеины низкой плотности, общий холестерин (ОХС), отношение ОХС / ЛПВП, триглицериды), исходные записи ЭКГ (12 отведений, длительность 10 с, частота 500 Гц) и автоматически полученные на их основе признаки. При наличии нескольких измерений одного показателя использовалось среднее значение. После удаления выбросов в выборку попало 6633 пациента (из них 2621 с СД 1-го или 2-го типа) в возрасте от 18 лет до 91 года.

Для предупреждения избыточного влияния пациентов с большим количество записей ЭКГ на всю выборку у каждого пациента было выбрано не более 5 случайным образом отобранных ЭКГ. Всего было получено 23 513 ЭКГ. ЭКГ были обработаны фильтром Баттерворта 3-го порядка с частотой фильтрации от 1 до 47 Гц, приведены к частоте 1280 Гц.

Для обучения использовалось 3 модели: 1) градиентный бустинг с помощью алгоритма LightGBM [6]; 2) полносвязная нейронная сеть (MLP); 3) гибридная сверточно-трансформерная нейронная сеть (CNN + Transformer). Модель 3 получала на вход исходный сигнал ЭКГ, а модели 1 и 2 — автоматически сформированные на основе ЭКГ признаки.

Результаты приведены в таблице. Методы глубокого обучения оказались предпочтительнее при работе с ЭКГ. Даже простейшая модель MLP была эффективнее градиентного бустинга на табличных данных с автома-

© И. А. Корзун, К. С. Егоров, 2024

тически сформированными ЭКГ признаками (AUC 0,60 и 0,53 соответственно). Наилучшие результаты были достигнуты при использовании лабораторных данных в сочетании с анамнезом и ЭКГ (AUC 0,91), при этом данные ЭКГ имели небольшое влияние (без ЭКГ AUC снизился на 0,002). При использовании данных анамнеза и ЭКГ наиболее эффективной оказалась модель (3) (AUC 0,76).

Заключение. Хотя результаты инвазивных диагностических исследований и имеют наибольшую предиктивную значимость при диагностике СД, сочетанное использование ЭКГ, данных анамнеза и неинвазивных исследований представляется перспективным для создания скринингового метода.

Результаты обучения моделей на различных группах признаков

Данные	Модель								
	LightGBM			MLP			CNN+Transformer		
	AUC	Sn	Sp	AUC	Sn	Sp	AUC	Sn	Sp
Анамнез	0,651	0,474	0,829	**0,720**	0,641	0,711			
Анализы	0,825	0,749	0,902	**0,896**	0,778	0,886			
Анамнез + анализы	0,835	0,758	0,911	**0,904**	0,795	0,897			
ЭКГ	0,530	0,327	0,734	0,601	0,378	0,738	**0,676**	0,199	0,840
Анамнез + ЭКГ	0,625	0,477	0,773	0,744	0,631	0,716	**0,756**	0,588	0,754
Анамнез + анализы + ЭКГ	0,812	0,751	0,873	**0,906**	0,810	0,882	0,905	0,835	0,832

Примечание. AUC — площадь под кривой; Sn — чувствительность; Sp — специфичность.

Литература

1. Reed J., Bain S., Kanamarlapudi V. A Review of Current Trends with Type 2 Diabetes Epidemiology, Aetiology, Pathogenesis, Treatments and Future Perspectives // Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy. 2021. Vol. 14. P. 3567–3602.

2. Ogurtsova K., Guariguata L., Barengo N. C. et al. IDF diabetes Atlas: Global estimates of undiagnosed diabetes in adults for 2021 // Diabetes Research and Clinical Practice. 2022. Vol. 183. P. 109118.

3. Mohsen F., Al-Absi H. R. H., Yousri N. A. et al. A scoping review of artificial intelligence-based methods for diabetes risk prediction // Npj Digital Medicine. 2023. Vol. 6 (1). P. 197.

4. Wee B. F., Sivakumar S., Lim K. H. et al. Diabetes detection based on machine learning and deep learning approaches // Multimedia Tools and Applications. 2023. Vol. 83 (8). P. 24153–24185.

5. Johnson, A. E. W., Bulgarelli L., Shen L. et al. MIMIC-IV, a freely accessible electronic health record dataset // Scientific Data. 2023. Vol. 10 (1). P. 1.

6. Ke G., Meng Q., Finley T. et al. LightGBM: A Highly Efficient Gradient Boosting Decision Tree // Proceedings of the 31st International Conference on Neural Information Processing Systems, Long Beach, CA, December 2017. P. 3149–3157.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-25

ГЕНОМНЫЙ НАДЗОР ЗА SARS-COV-2 И РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ХОДА ПАНДЕМИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЛАТФОРМЫ VGARUS *

GENOMIC SURVEILLANCE OF SARS-COV-2 AND RETROSPECTIVE ANALYSIS OF THE PANDEMIC IN THE RUSSIAN FEDERATION USING THE VGARUS PLATFORM

И. А. Котов[1,2], М. Р. Аглетдинов[1,2], Г. В. Роев[1,2], Е. В. Пимкина[1], М. И. Надтока[1], А. В. Пересадина[1], А. Ю. Бухарина[1], Д. В. Светличный[1], С. Е. Гончаров[1], А. В. Выходцева[1], Н. И. Борисова[1], М. Д. Чанышев[1], Д. Н. Агабалаев[1], В. В. Саенко[1], К. Ф. Хафизов[1], В. Г. Акимкин[1]

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

I. A. Kotov[1,2], M. R. Agletdinov[1,2], G. V. Roev[1,2], E. V. Pimkina[1], M. I. Nadtoka[1], A. V. Peresadina[1], A. Yu. Bukharina[1], D. V. Svetlichny[1], S. E. Goncharov[1], A. V. Vykhodtseva[1], N. I. Borisova[1], M. D. Chanyshev[1], D. N. Agabalaev[1], V. V. Saenko[1], K. F. Khafizov[1], V. G. Akimkin[1]

[1] *Central Research Institute of Epidemiology, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ ivan.kotov@phystech.edu

Аннотация

В ходе крупнейшего в России исследования нами были проанализированы геномные последовательности SARS-CoV-2, собранные по всей стране с мая 2020 г. по март 2024 г. и загруженные на платформу VGARus. Анализ выявил закономерности смены штаммов вируса в ходе пандемии новой коронавирусной инфекции.

Abstract

In the largest study of its kind in Russia, we analyzed SARS-CoV-2 genomic sequences collected across the country from May 2020 to March 2024 and uploaded to the VGARus platform. The analysis revealed patterns in the changing of viral strains during the COVID-19 pandemic.

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования (Next-Generation Sequencing, NGS) значительно снизило стоимость геномных исследований за последние 15 лет. Это сделало NGS неотъемлемой частью современной биологии и медицины, включая вирусологию, где новые методы секвенирования активно применяются для анализа вирусных геномов [1, 2]. Современные биоинформатические инструменты позволяют создавать и исследовать базы данных геномов патогенов, что играет важную роль в борьбе с инфекционными заболеваниями. Геномная эпидемиология позволяет отслеживать генетические изменения в патогенах, классифицировать их линии и оценивать их патогенность и способность к распространению. Эти исследования критически важны для разработки диагностических тестов, вакцин и стратегий борьбы с эпидемиями.

В период с 2020 по 2024 г. на территории Российской Федерации, благодаря совместным усилиям институтов Роспотребнадзора и других ведомств, была организована система исследования изменчивости SARS-CoV-2. Процесс включал первичное ПЦР-тестирование, секвенирование геномов и последующее типирование образцов. Полученные последовательности вместе с сопроводительными метаданными систематически загружались на агрегирующую платформу VGARus.

С использованием накопленной информации был проведен ретроспективный анализ частотной динамики вариантов SARS-CoV-2 (рис. 1). В 2020 г. наблюдалось разнообразие линий вируса без доминирующего явным образом варианта. В январе 2021 г. в России уже была обнаружена линия VOC-202012/01 («Альфа»), обладающая мутациями N501Y, P681H и Δ69-70, ассоциированными с повышенной способностью инфицировать клетки и уклоняться от иммунного ответа. Однако частота этой линии так и не успела вырасти до значений более 20 % по стране. Летом 2021 года доминирующим стал вариант «Дельта», вытеснивший все остальные. Его распространение увеличило число госпитализаций.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке федерального проекта «Санитарный щит», субсидий, выделенных по распоряжению Правительства РФ, а также за счет внутренних финансовых ресурсов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии.

© И. А. Котов, М. Р. Аглетдинов, Г. В. Роев, Е. В. Пимкина, М. И. Надтока, А. В. Пересадина, А. Ю. Бухарина, Д. В. Светличный, С. Е. Гончаров, А. В. Выходцева, Н. И. Борисова, М. Д. Чанышев, Д. Н. Агабалаев, В. В. Саенко, К. Ф. Хафизов, В. Г. Акимкин, 2024

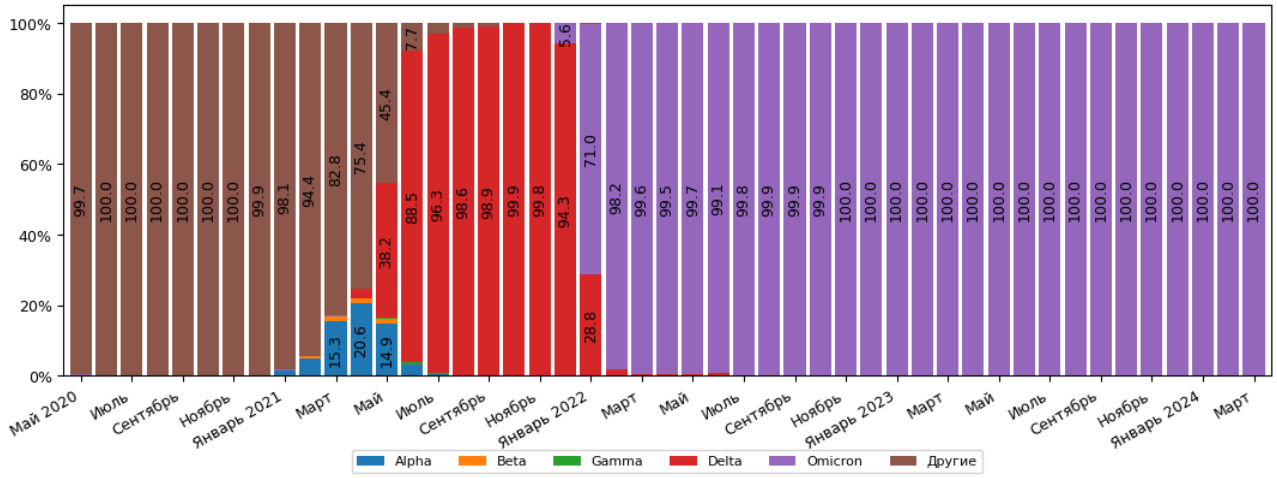


Рис. 1. Диаграмма частот распространенности значимых вариантов SARS-CoV-2 в Российской Федерации с мая 2020 г. по март 2024 г.

В декабре 2021 г. в России появился вариант «Омикрон», вызвавший кратковременный всплеск заболеваемости. Весь следующий год наибольшее распространение получали различные субварианты «Омикрона», такие как BA.5 и BQ.1*. В начале 2023 г. в стране появился рекомбинантный вариант XBB*, который впоследствии был наиболее частым в России большую часть года. При этом уже в ноябре в стране появился вариант BA.2.86 («Пирола»), также ставший доминирующим к началу 2024 г. Эти изменения подчеркивают необходимость постоянного геномного мониторинга для своевременного выявления новых вариантов и разработки эффективных стратегий общественного здравоохранения.

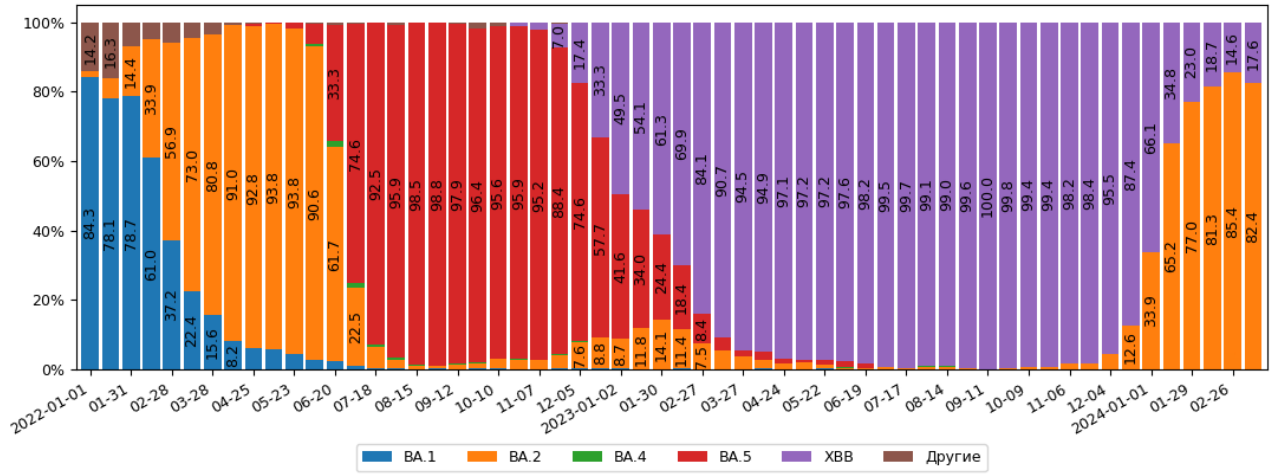


Рис. 2. Диаграмма частот распространенности сублиний варианта «Омикрон» в Российской Федерации с января 2022 г. по март 2024 г.

Проведенные наблюдения позволили обнаружить ряд закономерностей. В частности, каждая новая значимая линия вируса, становясь доминирующей, достигает порога в 50 % от общей популяции в течение полутора-трех месяцев. Период, в течение которого такая линия сохраняет наивысшую распространенность, варьируется от трех месяцев до года. Более детальный анализ показал, что до момента появления в стране линии BA.2.86 свою представленность повышали такие штаммы, как FL.1.5.1 и XBB.1.16.11, но темпы роста их распространенности были слишком медленными и составлял лишь около 15 % за полгода.

Полученные в рамках нашего исследования данные о динамике вариантов SARS-CoV-2 согласуются с результатами из иностранных источников, основанных на анализе последовательностей базы GISAID, а иногда уточняют их с учетом более широкой географии сбора образцов [3].

Создание российской платформы VGARus стало важной вехой в борьбе с COVID-19. На текущий момент в ней хранится более 320 000 последовательностей геномов SARS-CoV-2. Платформа помогает идентифициро-

вать новые варианты вируса, разрабатывать диагностические инструменты и принимать качественные решения в области здравоохранения. VGARus улучшила понимание динамики пандемии в России, а также представляет особенную ценность ввиду большого количества метаданных. В настоящее время платформа расширяется для мониторинга других вирусных патогенов, что делает ее еще более ценным ресурсом для вирусологов и специалистов по инфекционным заболеваниям.

Литература

1. Barzon L., Lavezzo E., Militello V. et al. Applications of Next-Generation Sequencing Technologies to Diagnostic Virology // IJMS. Vol. 12, No. 11. P. 7861–7884.

2. Akermi S., Jayant S., Ghosh A. et al. Viroinformatics for viral diseases: tools and databases // Translational Bioinformatics in Healthcare and Medicine, Elsevier. 2021. P. 171–182.

3. Xiao B., Wu L., Sun Q. et al. Dynamic analysis of SARS-CoV-2 evolution based on different countries // Gene. Vol. 916. P. 148426.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-26

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ И СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ИЗ *DIBOTHRIOCEPHALUS DENDRITICUS, DIBOTHRIOCEPHALUS LATUS, LIGULA INTERRUPTA* КАК ЭТАП ПОИСКА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗ-ИММУНОРЕГУЛЯТОРОВ [*]

BIOINFORMATIC AND STRUCTURAL ANALYSIS OF PROTEINS FROM *DIBOTHRIOCEPHALUS DENDRITICUS, DIBOTHRIOCEPHALUS LATUS, LIGULA INTERRUPTA* AS A STEP IN THE SEARCH FOR ACETYLCHOLINESTERASE-IMMUNOREGULATORS

Л. И. Кутырева[1], А. В. Попинако[2], Д. В. Диброва[3,4], А. В. Коношенкова[5], И. А. Кутырев[6]

[1] *Автономная некоммерческая организация «Общеобразовательная школа Центра педагогического мастерства», Москва*
[2] *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии им. А. Н. Баха, Москва*
[3] *НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова*
[4] *Факультет биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова*
[5] *Лаборатория транспорта ионов и солеустойчивости, Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва*
[6] *Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ*

L. I. Kutyreva[1], A. V. Popinako[2], D. V. Dibrova[3,4], A. V. Konoshenkova[5], I. A. Kutyrev[6]

[1] *Autonomous Non-Profit Organization General Education School of the Center of Pedagogical Mastery, Moscow*
[2] *Research Center of Biotechnology RAS, A. N. Bach Institute of Biochemistry, Moscow*
[3] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University*
[4] *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University*
[5] *K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow*
[6] *Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude*

✉ popinakoav@gmail.com

Аннотация

Транскриптом паразитов представляет большой интерес для поиска новых иммунорегуляторов, среди которых ученые особо выделяют ацетилхолинэстеразы. В данной работе представлен анализ последовательностей и структур ацетилхолинэстераз с возможным иммунорегуляторным эффектом. Были исследованы белки *Dibothriocephalus dendriticus, Dibothriocephalus latus*, *Ligula interrupta*.

Abstract

The transcriptome is of great interest for the search for new immunoregulators. Some acetylcholinesterases are classified by scientists as immunoregulators. This paper presents an analysis of the sequences and structures of acetylcholinesterases with a possible immunoregulatory effect. The proteins Dibothriocephalus dendriticus, Dibothriocephalus latus, Ligula interrupta were studied.

В настоящее время паразитизм рассматривается как наиболее распространенная форма симбиоза, при которой организм-хозяин находится в сложных взаимоотношениях с паразитом и окружающей средой. Паразиты модулируют иммунную систему хозяина таким образом, что у хозяина происходит снижение гипервоспалительных процессов. Молекулы паразита, участвующие в иммуномодуляции хозяина, представляют большой интерес и базу для поиска новых иммунорегуляторов для лечения аутоиммунных заболеваний человека.

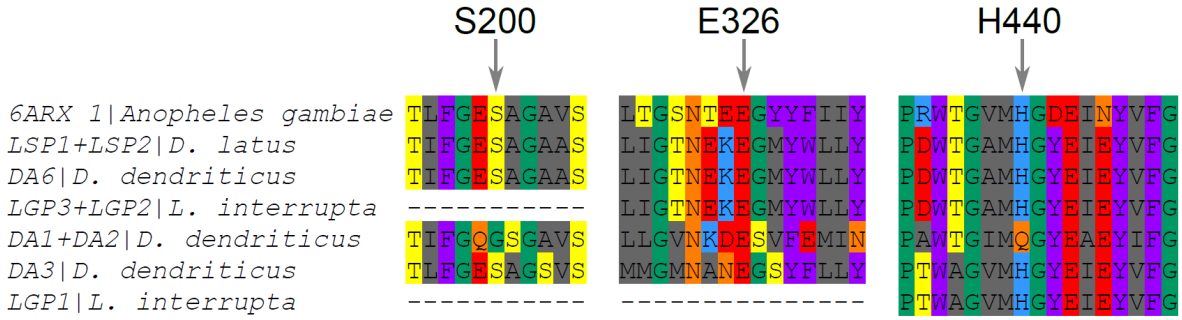
В данной работе представлен анализ последовательностей и структур белков как этап поиска ацетилхолинэстераз с иммунорегуляторным эффектом. Были исследованы белки из цестод лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* (плероцеркоид и половозрелая стадия), лентеца широкого *Dibothriocephalus latus*, ремнеца *Ligula interrupta*. Процедура составления базы данных и предварительный отбор ацетилхолинэстераз были опубликованы ранее [1].

[*] Исследование выполнено в рамках государственного задания Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (регистрационный номер 121030900141-8).

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИОЭБ СО РАН: Ж. Н. Дугарову, О. Е. Мазур, О. Б. Жепхолову, Л. В. Толочко, Л. Д. Сондуеву за помощь в сборе материала. Структурный анализ ацетилхолинэстераз проводится с применением оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М. В. Ломоносова и вычислительных ресурсов МСЦ РАН.

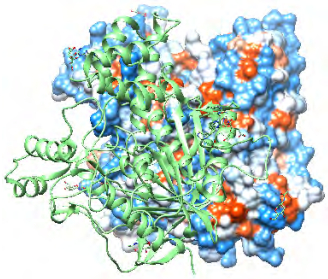
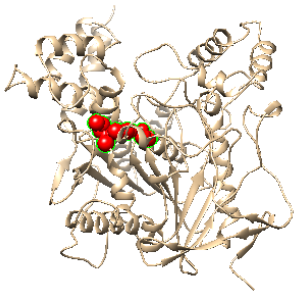
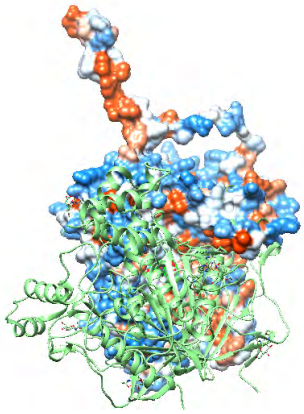
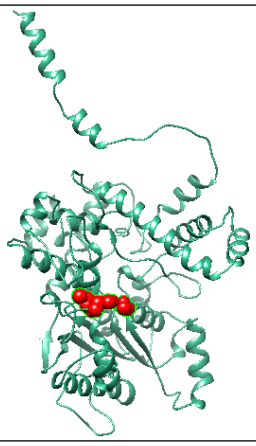
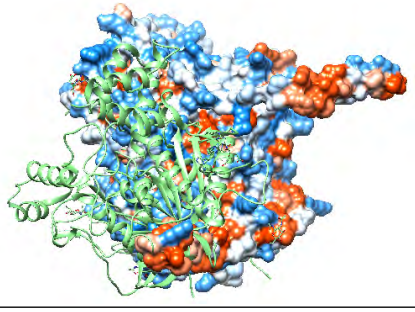
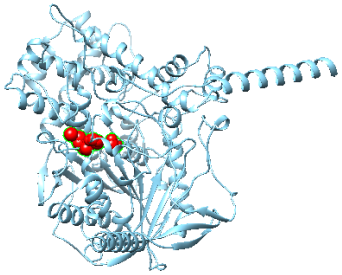
© Л. И. Кутырева, А. В. Попинако, Д. В. Диброва, А. В. Коношенкова, И. А. Кутырев, 2024

12 отобранных последовательностей были выровнены при помощи программы Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo), было найдено 4 последовательности (см. рисунок) с характерными для ацетилхолинэстераз остатками активного центра (у LSP2 из *Dibothriocephalus latus* (плероцеркоиды), DA3, DA4, DA6 из *Dibothriocephalus dendriticus* (половозрелые особи)).



Фрагменты множественного выравнивания 6 последовательностей, полученных путем объединения соответствующих частей транскриптов, и ацетилхолинэстеразы Малярийного комара, стрелками выделены позиции остатков активного центра, характерного для ацетилхолинэстераз, и их номера в последовательности комара

Сравнение (суперпозиция) моделей и структуры

Название белка, организм	**Гидрофобные поверхности субъединицы (красный цвет) и вторая субъединица структуры pdbid 6ARX (зеленый)**	**Остатки активного центра (красный цвет), одна субъединица**
pdbid 6ARX, Малярийного комара, *Anopheles gambiae*		
LSP2 из *Dibothriocephalus latus* (плероцеркоиды)		
DA6 из *Dibothriocephalus dendriticus* (половозрелые особи)		

Модели всех 12 последовательностей были построены в программе trRosetta (https://yanglab.qd.sdu.edu.cn/trRosetta/). Анализ поверхности моделей показал наличие гидрофобных областей. При сравнении 2 моделей (LSP2 и DA6) и структуры pdbid 6ARX (ближайшего гомолога — ацетилхолинэстеразы Малярийного комара) мы показали, что остатки активного центра совпадают по своей локации у всех молекул, а гидрофобная поверхность соответствует поверхности взаимодействия со второй субъединицей (см. таблицу), следовательно, исследуемые белки с большой вероятностью представляют собой димеры.

В результате впервые были предложены новые кандидаты-иммунорегуляторы на основе ацетилхолинэстераз, которые могли бы пройти в будущем экспериментальную проверку.

Литература

1. Кутырева Л. И., Кутырев И. А. Идентификация генов, кодирующих потенциальные иммунорегуляторные белки в транскриптомах ленточных червей // Достижения и проблемы ветеринарной медицины на Крайнем Севере Российской Федерации: сб. мат. междунар. науч.-практ. конф., посв. 115-летию организации Якутской бактериологической лаборатории и проведения научных исследований по ветеринарной медицине в Якутии. 2024. С. 640–648.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-27

СПОСОБ ОЦЕНКИ ЧИСЛА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК В КЛЕТОЧНОМ СФЕРОИДЕ ПОСРЕДСТВОМ МТТ-АНАЛИЗА

METHOD FOR ESTIMATING THE NUMBER OF VIABLE CELLS IN A CELL SPHEROID USING THE MTT ASSAY

А. К. Лапенко, Е. Р. Ольховая, П. С. Купцова, Е. Р. Ляпунова, Л. Н. Комарова

Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета МИФИ

A. K. Lapenko, E. R. Ol'hovaya, P. S. Kupcova, E. R. Lyapunova, L. N. Komarova

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering

✉ alianalapenko@yandex.ru

Аннотация

Одним из методов изучения жизнеспособности клеточных сфероидов является МТТ-тест. Однако этот тест не позволяет определить количество жизнеспособных клеток внутри сфероида на стадиях культивирования, а дает косвенное представление о метаболической активности клеток. В этом исследовании мы предлагаем метод оценки количества жизнеспособных клеток в клеточном сфероиде с использованием МТТ-теста.

Abstract

One of the methods for studying the viability of cell spheroids is the MTT test. However, this test does not permit the determination of the number of viable cells within the spheroid at different stages of cultivation. Instead, it provides an indirect indication of the metabolic activity of cells. In this study, we propose a method for estimating the number of viable cells in a cell spheroid using the MTT test.

Клеточные сфероиды являются одной из разновидностей трехмерных клеточных моделей, которые активно применяются в современных исследованиях [1]. Сферами их применения являются регенеративная медицины, скрининг эффективности и токсичности фармакологических соединений [2]. Клеточные сфероиды на данный момент занимают промежуточное звено между стандартным клеточным культивированием и проведением экспериментов *in vivo*, поэтому поиск методов, позволяющий характеризовать клеточные сфероиды, является актуальным. Одним из распространенных методов изучения жизнеспособности клеточных сфероидов является МТТ-тест [3]. Однако МТТ-тест не позволяет напрямую определить количество жизнеспособных клеток внутри сфероида на стадиях культивирования, а дает косвенное представление о метаболической активности клеток. В данном исследовании предложен способ оценки числа жизнеспособных клеток в клеточном сфероиде посредством МТТ-анализа.

В качестве объекта исследования была выбрана клеточная линия — клетки почки эмбриона человека HEK 293. Для создания кривой, описывающей изменение оптической плотности в зависимости от концентрации клеток, были использованы следующие концентрации клеток: 800, 1600, 3200, 6400, 12800, 25600, 51200, 102400 клеток/лунка. Необходимых клеточных концентраций достигали серией разведений клеточной суспензии. По достижении адгезии клеток к поверхности лунки планшета проводили МТТ-тест по стандартной методике [4]. Клеточные сфероиды получали путем культивирования на низкоадгезивной поверхности, посевные концентрации составили 5000, 8000, 10000, 15000, 30000, 60000 клеток/сфероид. МТТ-тест на клеточных сфероидах на разных стадиях культивирования проводили согласно литературным источникам [5]. Оптическую плотность определяли при длине волны 530 нм. Построение кривой осуществляли с помощью программного обеспечения Rstudio. Для построения использовали функцию nls.

На клетках почки эмбриона человека HEK 293 была получена экспоненциальная кривая, описывающая изменение оптической плотности в зависимости от натурального логарифма концентрации клеток (рис. 1). Коэффициент детерминации (R^2) составил 0,84, что свидетельствует о том, что полученная кривая описывает данные с высокой точностью

С помощью полученной кривой было рассчитано количество жизнеспособных клеток в составе клеточных сфероидов HEK-293 (рис. 2).

© А. К. Лапенко, Е. Р. Ольховая, П. С. Купцова, Е. Р. Ляпунова, Л. Н. Комарова, 2024

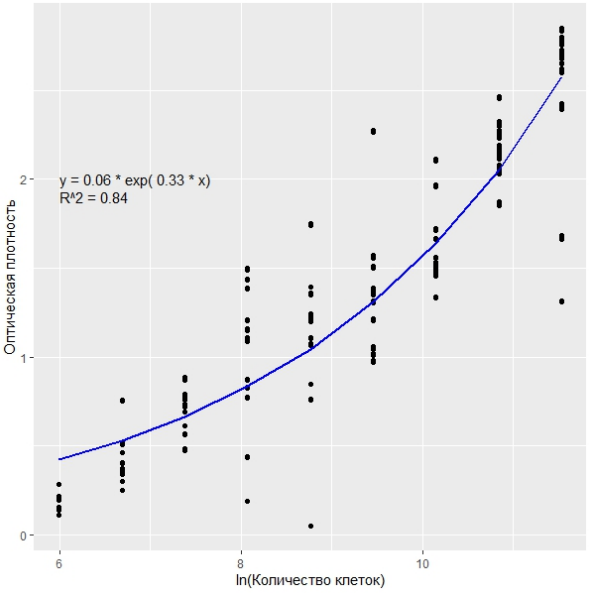


Рис. 1. Изменение оптической плотности в зависимости от количества клеток почки эмбриона человека HEK 293

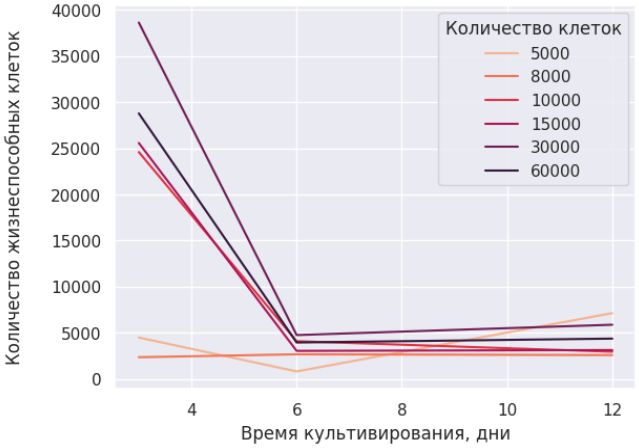


Рис. 2. Рассчитанные показатели количества жизнеспособных клеток в составе сфероидов на разных стадиях культивирования

Данный способ позволяет определять количество жизнеспособных клеток в составе клеточного сфероида с помощью МТТ-теста на разных этапах культивирования.

Литература

1. Białkowska K. et al. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures — examples of methods of preparation and the most important application // Intern. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, No. 17. P. 6225.

2. Badr-Eldin S. M. et al. Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects // Pharmaceuticals (Basel). 2022. Vol. 27. P. 926.

3. Меньших К. А., Воинова В. В., Бонарцев А. П. Создание 3D клеточных сфероидов на микросферах из поли-3-окси-бутирата // Актуальная биотехнология. 2019. № 3. С. 591–592.

4. Яковлев Д. С. и др. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7 // Волгоградский научно-медицинский журнал. 2020. № 1. С. 58–61.

5. Аникина Л. В. и др. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина // Фундаментальные исследования. 2014. № 12-7. С. 1423–1427.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-28

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОРФИРИНОВОГО КОЛЬЦА В СОСТАВЕ ЦИТОХРОМА *C* С КАРДИОЛИПИНОМ АКТИВИРОВАННОЙ КУМАРИНОМ C_{525} ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА

STUDY OF THE STRUCTURE OF THE PORPHYRIN RING WITHIN THE CYTOCHROME *C*-CARDIOLIPIN-ACTIVATED COUMARIN C_{525} CHEMILUMINESCENCE UNDER THE ACTION OF THE COMPLEX

И. Н. Левченко[1,5], В. С. Панкратов[2], Г. К. Владимиров[3], А. А. Левченко[4], И. В. Володяев[5]

[1]*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова, Москва*
[2]*Московский авиационный институт (национальный исследовательский университет)*
[3]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова*
[4]*Пермский национальный исследовательский политехнический университет*
[5]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

I. N. Levchenko[1,5], V. S. Pankratov[2], G. K. Vladimirov[3], A. A. Levchenko[4], I. V. Volodyaev[5]

[1]*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[2]*Moscow Aviation Institute (National Research University)*
[3]*Sechenov First Moscow State Medical University*
[4]*Perm National Research Polytechnic University*
[5]*Lomonosov Moscow State University*

✉ irnlevchenko@yandex.ru

Аннотация

Полученные нами результаты могут стать основой для создания лекарственных препаратов нового образца, которые являются элементами клетки и имеют терапевтический эффект. Модулирование и математическое моделирование порфиринового кольца в составе гетерогенного катализатора комплекса цитохрома *C* с кардиолипином в окружении флуоресцентного зонда физического активатора природного красителя кумарина C_{525} показало, что хемилюминесценция люминола на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны, при этом сам кардиолипин — это «двойной» глицерофосфолипид, который считается протонной ловушкой и обладает иммунными свойствами.

Abstract

Our results could become the basis for the creation of new drugs. Which are elements of the cell and have a therapeutic effect. Modulation and mathematical modeling of the porphyrin ring in as part of a heterogeneous catalyst of cytochrome *C* complex with cardiolipin, surrounded by a fluorescent probe of a physical activator of the natural dye coumarin C_{525} showed that the chemiluminescence of luminol is 3–4 orders of magnitude higher than that of the excited ketones, with cardiolipin itself being a “double” glycerophospholipid that is is considered a proton trap and has immune properties.

Применение физических активаторов способствует усилению интенсивности свечения на 2–3 порядка, не влияя на химические процессы, проходящие в системе химических реакций. Физический активатор природный краситель кумарин C_{525} перехватывает возбуждение у триплетно-возбужденных кетонов, образующихся при рекомбинации перекисных радикалов по механизму Рассела, и является флуоресцентным зондом. Модулирование и математическое моделирование порфиринового кольца в составе гетерогенного катализатора комплекса цитохрома *C* с кардиолипином в окружении флуоресцентного зонда физического активатора природного красителя кумарина C_{525} показало, что хемилюминесценция люминола на 3–4 порядка выше, чем сами возбужденные кетоны, при этом сам кардиолипин — это «двойной» глицерофосфолипид, который считается протонной ловушкой и обладает иммунными свойствами.

Точность нашего исследования определяется наличием кардиолипина для стабилизации pH, тушением Fe^{2+} и присутствием природного красителя физического активатора флуоресцентного зонда кумарина C_{525}. Факторы, которые искажают параметры моделирования порфиринового кольца в окружении флуоресцентного зонда физического активатора кумарина C_{525}: недостаточное добавление пероксида водорода, избыточное количество азота (II), метанола, денатурация белка, изменение конформации цитохрома *C* в комплексе цитохрома *C* с кардиолипином. Проанализированы системы липопероксидазной и квазилипоксигеназной реакций.

© И. Н. Левченко, В. С. Панкратов, Г. К. Владимиров, А. А. Левченко, И. В. Володяев, 2024

Гетерогенный катализатор цитохром *C* в комплексе с кардиолипином отличается от нативного цитохрома по следующим свойствам:

1) обладает флуоресценцией тирозиновых и триптофановых остатков;

2) теряет поглощение в полосе Соре (405–410 нм) в результате разрыва координационной связи железа гема с серой Met(80) в цитохроме *C*;

3) обладает ферментативной активностью;

4) катализирует образование липидных радикалов в мембране в окружении флуоресцентного зонда физического активатора природного красителя кумарина C_{525};

5) ферментативная активность зависит не только от концентрации цитохрома *C* с кардиолипином, но и от соотношения, определяющего процент абсолютного количества денатурированной формы;

6) микровязкость мембраны в окружении физического активатора природного красителя физического активатора кумарина C_{525} обладает разным коэффициентом поляризации;

7) при нейтральном pH гем в цитохроме *C* существует в низко-спиновой конфигурации, и железный центр шестиугольно координирован пиролическими азотами из порфиринового кольца и аксиальными лимандами Met(80) и His(18) апопротеина;

8) при образовании перекиси водорода в мембранном белке происходит удаление ацильной цепи, несущей перекисную группу.

Природный краситель кумарин C_{525} — «классический» физический активатор хемилюминесценции люминола — окисляется цитохромом *C* в комплексе с кардиолипином, при этом скорость этого окисления ограничивается лишь концентрацией самого цитохрома *C*, который тоже разрушается в составе цитохрома *C* в комплексе с кардиолипином под действием пероксида водорода.

Моделирование порфириного кольца димерной структуры фермента — кардиолипина, катализирующей образование пероксида водорода кардиолипина, показало, что следствием его являются: 1) конформационные изменения последнего; 2) перемещение его на внешнюю митохондриальную мембрану; 3) образование поры, через которую выходит цитохром *C* в цитозоль.

Полученные нами результаты могут стать основой для создания лекарственных препаратов нового образца, которые являются элементами клетки, соответственно, влияют на раковые клетки и нечувствительны к синтетическим препаратам.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-29

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ *

COMPARATIVE BIOINFORMATICS ANALYSIS OF NUCLEAR AND CYTOPLASMIC ACTIN-BINDING PROTEINS

Я. И. Мокин, О. И. Поварова, И. А. Антифеева, К. К. Туроверов, И. М. Кузнецова, А. В. Фонин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Y. I. Mokin, O. I. Povarova, I. A. Antifeeva, K. K. Turoverov, I. M. Kuznetsova, A. V. Fonin

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ mokinyakov@mail.ru

Аннотация

Актин — важный белок, присутствующий в цитоплазме и ядре любой эукариотической клетки. Его функциональное разнообразие обеспечивается взаимодействием с актин-связывающими белками. В работе проведен сравнительный анализ ядерных и цитоплазматических актин-связывающих белков, включающий 3 этапа: анализ генной онтологии, анализ физических взаимодействий белков, анализ структурных особенностей.

Abstract

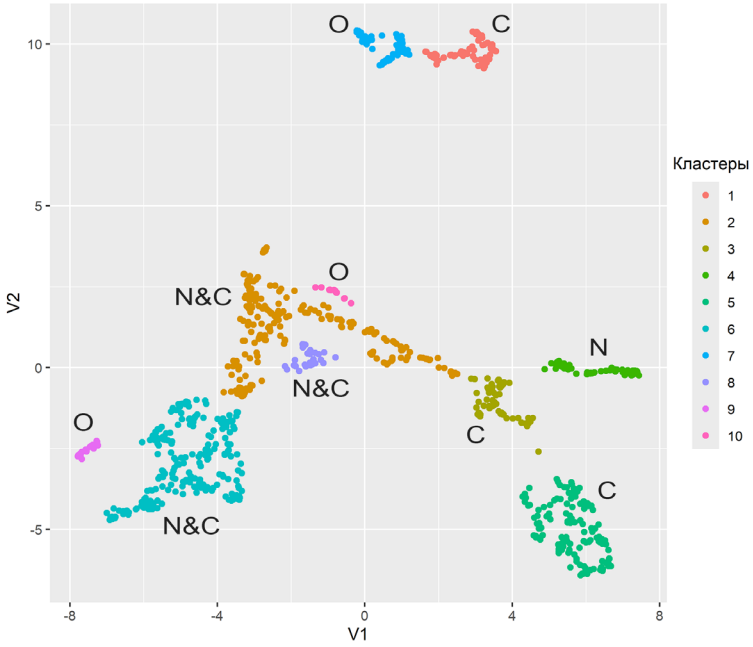
Actin is an important protein present in the cytoplasm and nucleus of every eukaryotic cell. Its functional diversity is provided by interaction with actin-binding proteins. The work provides a comparative analysis of nuclear and cytoplasmic actin-binding proteins, including 3 stages: analysis of gene ontology, analysis of physical interactions of proteins, analysis of structural features.

Актин является ключевым белком системы мышечного сокращения, который также присутствует в цитоплазме и ядре немышечных клеток. В цитоплазме двигательная и каркасная функция актина обеспечивается его способностью полимеризоваться в F-актин. В ядре большая часть актина присутствует в глобулярной форме и участвует в процессах, связанных с генетическим аппаратом клетки, включая транскрипцию и репарацию ДНК. Широкий спектр внутриклеточных функций актина тесно связан с его взаимодействием с более чем 800 белками [1, 2], которые вместе называются актин-связывающими белками (*англ.* Actin-binding proteins, ABP). Однако взаимодействие с актином хорошо изучено лишь для небольшой части ABP. Поскольку функциональная роль ядерного актина существенно отличается от роли актина в цитоплазме клетки, **целью** данного исследования было сравнение интерактома цитоплазматического и ядерного актина.

Биоинформатический анализ 886 ABP показал, что по локализации в клетке их можно разделить на четыре группы: 1) только ядерные, 2) только цитоплазматические, 3) ядерно-цитоплазматические, 4) прочие. Анализ генной онтологии (GO) ABP показывает, что большинство белков из групп 2 и 3 выполняют одну или две функциональные роли в клетке, тогда как ядерные белки (группа 1) в основном участвуют в большом разнообразии биологических процессов. Показано, что функциональные особенности белков разных компартментов связаны с их структурными особенностями. ABP представляют собой в первую очередь неупорядоченные белки, большинство из которых находятся в немембранных органеллах (*англ.* Membraneless organelles, MLO), образующихся в результате разделения фаз жидкость-жидкость (*англ.* Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) белков. Интересно, что хотя ядерные белки значительно более склонны к LLPS, чем цитоплазматические белки (44 против 25 %), драйверов образования MLO в цитоплазме значительно (в четыре раза) больше, чем в ядре. На основании аминокислотных последовательностей рассматриваемых белков были выделены 13 структурных параметров, для которых методами сокращения размерности и кластеризации было получено 10 кластеров ABP, функциональный анализ которых показал взаимосвязь рассматриваемых параметров и биологических процессов (см. рисунок). Были исследованы сети белок-белковых взаимодействий ABP. С помощью методов кластеризации на безразмерных графах идентифицировано 28 физически взаимодействующих кластеров актина и проанализирована их функциональная роль в клетке.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-15-00494).

© Я. И. Мокин, О. И. Поварова, И. А. Антифеева, К. К. Туроверов, И. М. Кузнецова, А. В. Фонин, 2024



Кластер	Биологические процессы
1	Регуляция нуклеации актина Организация митохондрий Регуляция вирусного генетического материала
2	Регуляция процессов репарации ДНК, транскрипции ДНК и организации
3	Регуляция полимеризации и деполимеризации актина
4	Регуляции процессов репарации ДНК, транскрипции ДНК, организации хроматина и его модификации
5	Транспорт электронов в митохондриях Клеточное дыхание Организация актиновых филаментов
6	Регуляция апоптоза
7	Сборка и организация ламеллоподий Сигнальные пути апоптоза
8	Реорганизация цитоскелета в ходе
9	Регуляция активности липопротеиновой липазы
10	Регуляция посттрансляционных модификаций Поддержание теломер

Анализ взаимосвязи структурных параметров и биологических процессов. Слева отображение структурных параметров на плоскости, полученное методом umap. Кластеры определены алгоритмом DBScan. Буквами возле кластеров отмечена клеточная локализация кластера по локализации наибольшего числа его участников. Обозначения: *N* — ядро, *C* — цитоплазма, *N & C* — совместная локализация в ядре и цитоплазме, *O* — другие компартменты. Справа — биологические процессы кластеров

Литература

1. Povarova O. I. et al. Actinous enigma or enigmatic actin: Folding, structure, and functions of the most abundant eukaryotic protein // Intrinsically disordered proteins. 2014. Vol. 2, No. 1. P. e34500.

2. Guharoy M. et al. Intrinsic structural disorder in cytoskeletal proteins. Cytoskeleton (Hoboken). 2013. Vol. 70 (10). P. 550–571.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-30

ОСТРАЯ КРОВОПОТЕРЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ PAMP-ГЕНА *CLEC5A* В ЭРИТРОИДНЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ*

ACUTE BLOOD LOSS INDUCES INCREASED EXPRESSION OF THE PAMP GENE *CLEC5A* IN MURINE BONE MARROW ERYTHROID CELLS

К. В. Назаров, Ю. А. Шевченко, Р. Ю. Перик-Заводский,
О. Ю. Перик-Заводская, С. Алрхмун, М. О. Волынец, С. В. Сенников

НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

K. V. Nazarov, Y. A. Shevchenko, R. Y. Perik-Zavodskii,
O. Y. Perik-Zavodskaia, S. Alrhmoun, M. O. Volynets, S. V. Sennikov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ kirill.lacrimator@mail.ru

Аннотация

Острая кровопотеря — состояние, сопровождающее большинство случаев физической травмы, оказывающее влияние на все ростки костного мозга, в том числе и на эритроидные ядросодержащие клетки. Мы изучили транскриптом генов иммунного ответа мышиных эритроидных ядросодержащих клеток на острую кровопотерю с помощью профилирования на платформе NanoString и обнаружили, что в эритроидных клетках костного мозга мыши после острой кровопотери наблюдается значительное повышение экспрессии гена *Clec5a*, белковый продукт этого гена реагирует на патоген-ассоциированные молекулярные паттерны. Мы предполагаем, что это может помочь эритроидным ядросодержащим клеткам костного мозга обнаруживать и уничтожать патогены антимикробными белками кальпротектина и кателицидина, гены которых (*S100a8, S100a9* и *Camp*) доминируют по экспрессии в эритроидных клетках костного мозга мышей.

Abstract

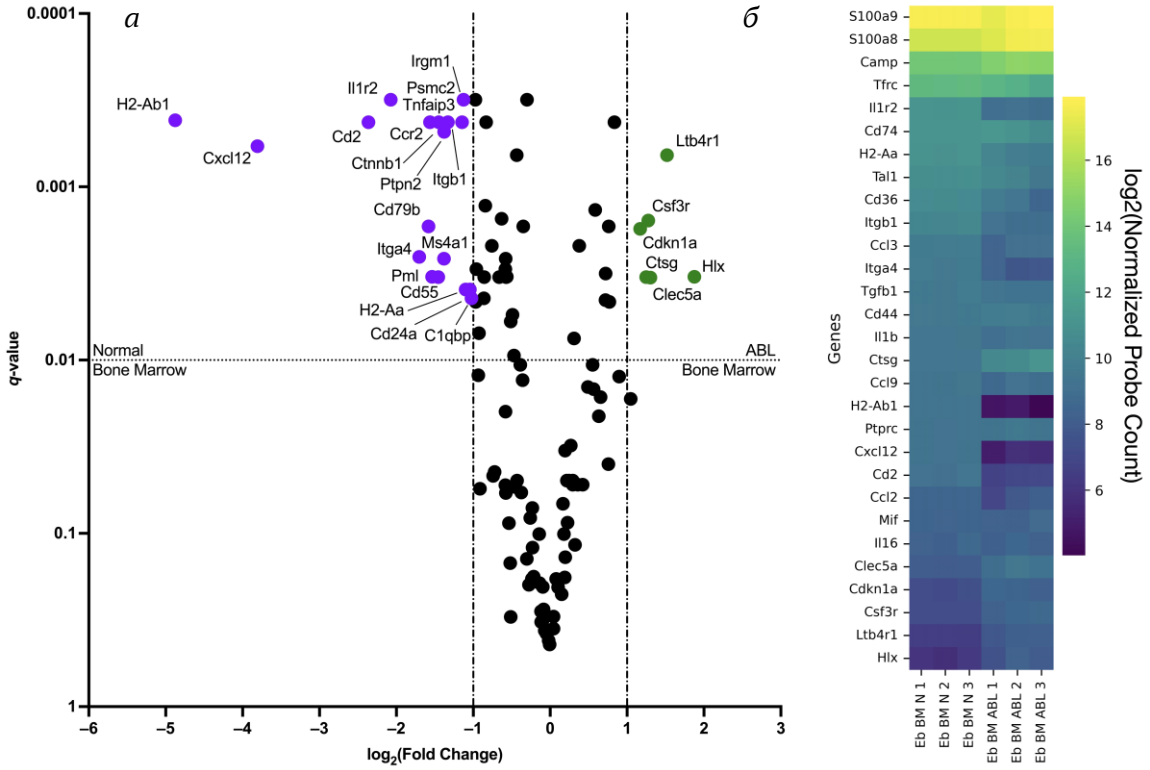
Hemorrhage, a condition that accompanies most physical trauma cases, affects all bone marrow lineages, including erythroid nucleated cells. In this study, we studied the immune response genes transcriptome of murine erythroid cells to acute blood loss using NanoString immune transcriptome profiling. We observed that acute blood loss up-regulate pathogen-associated molecular pattern sensing gene *Clec5a* in post-acute blood loss murine bone marrow erythroid cells. We believe that the up-regulation of the *Clec5a* gene in bone marrow erythroid cells could help bone marrow erythroid cells detect and eliminate pathogens with the help of reactive oxygen species and antimicrobial proteins calprotectin and cathelicidin, the genes of which (*S100a8, S100a9, and Camp*) dominate the expression in bone marrow erythroid cells of mice.

Цель — определение иммунотранскриптомного профиля эритроидных ядросодержащих клеток костного мозга в норме (n = 3) и после острой кровопотери (n = 3).

Материалы и методы. Мы получали самцов мышей ♂F1 CBA×C57Bl6 в возрасте 3–5 месяцев из вивария Института цитологии и генетики и использовали их во всех экспериментах. Все эксперименты с использованием мышей были одобрены локальным этическим комитетом НИИФКИ. Острую кровопотерю проводили следующим образом: у мышей под изофлурановым наркозом собирали ~0,5–0,8 мл крови из ретроорбитального синуса с помощью стеклянного капилляра с заостренным кончиком. На третьи сутки после начала эксперимента мышей подвергали эвтаназии, асептически собирали бедренные кости (нормальный костный мозг (n = 4), костный мозг после острой кровопотери (n = 4)) и селезенки (нормальная селезенка (n = 4), селезенка после острой кровопотери (n = 4)). Клетки костного мозга получали путем промывания костномозгового канала фосфатно-солевым буфером. Спленоциты получали путем гомогенизации всей селезенки в фосфатно-солевом буфере в стеклянном гомогенизаторе. Спленоциты центрифугировали в градиенте плотности фиколла-урографина. Мы проводили магнитное разделение мононуклеарных клеток селезенки и клеток костного мозга с использованием анти-Ter-119-биотинилированных антител и магнитных бусин, связанных стрептавидином, согласно протоколам производителя для получения Ter-119+ эритроидных ядросодержащих клеток. Мы выделили тотальную РНК из 500 000 Ter-119+ эритроидных ядросодержащих клеток с помощью набора Total RNA Purification Plus Kit и измерили концен-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 0415-2024-0012).

© К. В. Назаров, Ю. А. Шевченко, Р. Ю. Перик-Заводский, О. Ю. Перик-Заводская, С. Алрхмун, М. О. Волынец, С. В. Сенников, 2024



Анализ дифференциальной экспрессии генов: *а* — Volcano-график ДЭГ, *б* — тепловая карта ДЭГ и ключевых генов эритроидных ядросодержащих клеток мыши

трацию тотальной РНК в каждом образце на приборе Qubit 4. Мы проводили профилирование экспрессии генов с помощью аналитической системы NanoString nCounter SPRINT Profiler, используя панель nCounter Mouse Immunology v1 (561 ген, связанный с иммунитетом, 15 генов домашнего хозяйства, 6 положительных и 8 отрицательных контролей). Нормализация экспрессии генов и контроль качества образцов проводились в программе nSolver 4 с использованием синтетических положительных контролей и включенных в панель генов-домохозяев *Gapdh, Rpl19, Ppia, Oaz1, Eef1g, Polr2a, G6pdx, Gusb, Sdha* и *Alas1*. Данные о количестве экспрессий генов были преобразованы при помощи лог2-трансформации. Затем мы провели анализ дифференциальной экспрессии генов с помощью множественных t-тестов (считали Fold Change > 2 или Fold Change < −2 и *q*-значения < 0,01 статистически значимыми) и построили Volcano-график в GraphPad Prism 10.2.3. С помощью программы Bioinfokit мы построили тепловую карту, на которой были показаны ключевые гены эритроидных клеток с повышенным уровнем экспрессии.

Результаты. Мы обнаружили, что после острой кровопотери Ter-119+ эритроидные ядросодержащие клетки из костного мозга имели более высокую экспрессию генов: *Csf3r, Cdkn1a, Ctsg, Hlx, Clec5a* и *Ltb4r1*; и значительно более низкую экспрессию генов: *Cxcl12, Il1r2, Ccr2, Psmc2, Tnfaip3, Cd2, Cd79b, Cd55, Cd24a, C1qbp, Pml, Ms4a1, Itga4, Itgb1, Ptpn2, Ctnnb1, Irgm1, H2-Aa* и *H2-Ab1* (см. рисунок).

Исследованные образцы тотальной РНК экспрессировали сигнатурные гены эритроидных клеток *Tfrc, Tal1, Cd36, Itga4* и *Itgb1* в большом количестве копий, что свидетельствовало о высокой чистоте магнитно-сортированных эритроидных ядросодержащих клеток.

Выводы. Острая кровопотеря активно влияет на транскриптом эритроидных ядросодержащих клеток мыши и приводит к повышению экспрессии гена *Clec5a*, что может свидетельствовать о роли эритроидных ядросодержащих клеток костного мозга в надзоре за патогенами, которые эритроидные ядросодержащие клетки, вероятно, могут уничтожать при помощи антимикробных белков кальпротектина и кателицидина, гены которых (*S100a8, S100a9* и *Camp*) доминируют по экспрессии в эритроидных клетках костного мозга мышей [1].

Литература

1. Perik-Zavodskaia O., Perik-Zavodskii R., Nazarov K. et al. Murine Bone Marrow Erythroid Cells Have Two Branches of Differentiation Defined by the Presence of CD45 and a Different Immune Transcriptome Than Fetal Liver Erythroid Cells // Intern. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24 (21). P. 15752.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-31

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССА ПОГЛОЩЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ КЛЕТКАМИ *

STATISTICAL ANALYSIS OF NANOPARTICLE UPTAKE BY CELLS

М. А. Никишина[1], С. П. Федотов[2], Е. В. Маковеева[1], В. Шолохов[1]

[1] Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург
[2] Манчестерский университет, Великобритания

M. A. Nikishina[1], S. P. Fedotov[2], E. V. Makoveeva[1], V. Sholokhov[1]

[1] Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg
[2] The University of Manchester, United Kingdom

✉ margarita.a.nikishina@gmail.com

Аннотация

Проанализированы экспериментальные данные по поглощению наночастиц альвеолярным макрофагом крысы. Был проведен статистический анализ распределения ямок на поверхности одного макрофага на основе ограниченной выборки из 100 и 200 субрегионов. Показано, что отрицательное биномиальное распределение обеспечивает более точную модель для экспериментально наблюдаемых ямок на поверхности одной клетки.

Abstract

Experimental data on nanoparticle uptake by rat alveolar macrophages were analyzed. The distribution of pits on the surface of a single macrophage was statistically analyzed based on a limited sample of 100 and 200 subregions. It was shown that the negative binomial distribution provides a more accurate model for experimentally observed pits on the surface of a single cell.

Понимание механизмов поглощения клетками наночастиц необходимо для обеспечения безопасного и эффективного применения этих частиц в медицине [1]. В ряде экспериментов по изучению поглощения наночастиц [2] было установлено, что на клеточное поглощение влияет целый ряд факторов, таких как размер и форма наночастиц, характеристики мембраны и т. д. [3]. Предсказать поведение популяции наночастиц возможно с помощью обычных статистических распределений. Казалось бы, стохастическая генерация везикул, нагруженных наночастицами (NLVs), будет следовать распределению Пуассона, но Саммерс и его коллеги [4] обнаружили, что значение дисперсии выше значения математического ожидания. Они стали рассматривать модель распределения вероятностей с чрезмерной дисперсией. Риз и др. [5] также статистически проанализировали распределение наночастиц в клетках и обнаружили, что отрицательное биномиальное распределение является наилучшей моделью кривой, соответствующей эмпирическому распределению NLVs. Они предложили вероятностную модель, в которой образование эндосом на клеточной мембране может быть описано пространственно-временным пуассоновским процессом, зависящим от площади клеток, и обнаружили, что площадь клеток в популяции имеет гамма-распределение, что приводит к отрицательному биномиальному распределению для везикул, нагруженных наночастицами.

На основе этих данных был проведен статистический анализ экспериментальных данных, полученных во время изучения фагоцитарной активности легочных макрофагов и нейтрофильных лейкоцитов крысы [6]. Для изучения реакции нижних дыхательных путей на наночастицы использовалась интратрахеальная инстилляция водной суспензии, содержащей наночастицы. Был проведен анализ ультраструктурных повреждений клеток, вызванных наночастицами. Топология клеточных поверхностей макрофагов была исследована с помощью полуконтактной атомно-силовой микроскопии. На поверхности альвеолярных макрофагов наблюдались множественные ямки (рис. 1). Размер этих ямок увеличивается с ростом размера наночастиц. Кроме того, наночастицы меньшего размера приводили к более высокой концентрации ямок на поверхности. Предполагается, что эти ямки являются результатом начальной стадии активного эндоцитоза, а не просто «следами», оставленными частицами, пассивно проникающими через клеточную мембрану и образующими отверстие.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-677).

© М. А. Никишина, С. П. Федотов, Е. В. Маковеева, В. Шолохов, 2024

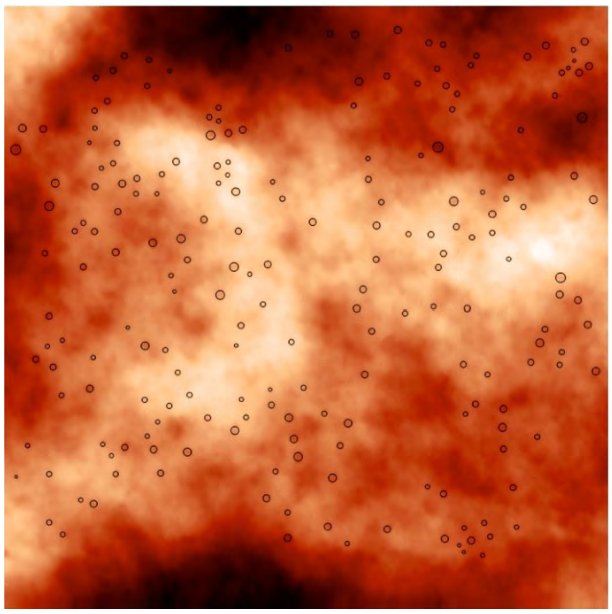


Рис. 1. Обработанное изображение поверхности макрофага площадью 4 мкм^2 с наночастицами оксида меди со средним диаметром 20 нм. Ямки на поверхности альвеолярного макрофага обведены для лучшей визуализации [6]

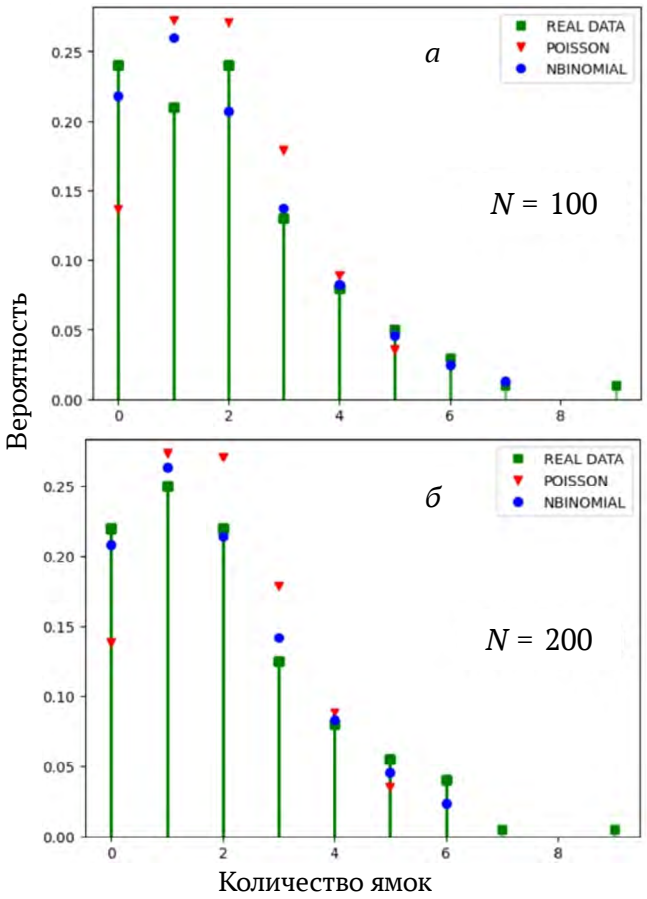


Рис. 2. а) N = 100. Эмпирическое распределение (*зеленый*), пуассоновское (*красные треугольники*) и отрицательное биномиальное распределение (*синие кружки*) для числа ямок на поверхности клетки с площадью S = 0,04 мкм^2. Эмпирические среднее и дисперсия составляют 1,99 и 3,32. Для отрицательного биномиального распределения значение логарифмического правдоподобия равно −185,1, а для распределения Пуассона оно равно −192,42; a = 2,97 и p = 0,59; *b*) N = 200. Эмпирические среднее и дисперсия равны 1,98 и 3,10. Для отрицательного биномиального распределения с a = 3,51 и p = 0,63 значение логарифмического правдоподобия равно −366,91, а для распределения Пуассона оно равно −378,26

На рис. 2 представлены две выборки разного размера. В обоих случаях мы наблюдаем заметную дисперсию. Поскольку известное распределение Пуассона имеет среднее значение, равное дисперсии, то оно не подходит для наших данных. Видно, что отрицательное биномиальное распределение (*синие кружки*) для N = 200 хорошо согласуется с эмпирическим распределением и что увеличение размера выборки приводит к более точной подгонке отрицательного биномиального распределения к эмпирическим данным, особенно для меньших значений количества ямок, таких как k = 0, 1, 2. Очевидно, что распределение Пуассона (*красные треугольники*) плохо подходит для наших данных.

Литература

1. Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery // Cellular and Molecular Life Sciences. 2009. Vol. 66. P. 2873–2896.

2. Shin H. J., Kwak M., Joo S., Lee J. Y. Quantifying fluorescent nanoparticle uptake in mammalian cells using a plate reader // Scientific Reports. 2022. Vol. 12. P. 20146.

3. Lesniak A et al. Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its Effect on Nanoparticle Uptake Efficiency // Journal of the American Chemical Society. 2013. Vol. 135. P. 1438–1444.

4. Summers H. D. et al. Statistical analysis of nanoparticle dosing in a dynamic cellular system // Nature Nanotechnology. 2011. Vol. 6. P. 170–174.

5. Rees P., Wills J. W., Brown M. R. et al. The origin of heterogeneous nanoparticle uptake by cells // Nature Communications. 2019. Vol. 10. P. 2341.

6. Katsnelson B. A. et al. Uptake of Some Metallic Nanoparticles by, and their Impact on Pulmonary Macrophages in Vivo as Viewed by Optical, Atomic Force, and Transmission Electron Microscopy // Nanomedicine & Nanotechnology. 2012. Vol. 3. P. 1.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-32

ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ МОДЕЛЕЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ НА ОСНОВАНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АТЕРОСКЛЕРОЗА *

PREDICTIVE CAPABILITY OF MACHINE LEARNING MODELS BASED ON CLINICAL INDICATORS OF ATHEROSCLEROSIS

Н. А. Орехов, Д. Д. Бородко, Е. М. Плешко, А. В. Омельченко

Лаборатория молекулярно-генетического моделирования инфламейджинга, НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

N. A. Orekhov, D. D. Borodko, E. M. Pleshko, A. V. Omelchenko

Laboratory of Molecular Genetic Modeling of Inflammaging, Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

✉ www.fuper@gmail.com

Аннотация

Атеросклероз — хроническое заболевание, входящее в тройку наиболее частых причин смертности в РФ. Цель работы — создать модели машинного обучения для прогнозирования атерогенеза на период 3–12 месяцев по клиническим показателям, в том числе по ЛНП-ЦИК. Данные 101 пациента показали, что метод дерева решений обеспечивает лучшую оценку прогноза (специфичность 98,9 %, точность 94,1 %).

Abstract

Atherosclerosis is a chronic disease and one of the top three causes of mortality in Russia. The aim of this study is to create machine learning models to predict atherogenesis over a period of 3 to 12 months based on clinical indicators, including LDL-CIC. Data from 101 patients demonstrated that the decision tree method provides the best predictive assessment (specificity 98.9 %, accuracy 94.1 %).

Атеросклероз — хроническое заболевание артерий, приводящее к серьезным сердечно-сосудистым заболеваниям, включая инфаркт миокарда и инсульт. Циркулирующие иммунные комплексы, содержащие липопротеины низкой плотности (ЛНП-ЦИК), играют ключевую роль в инициации ранних стадий атерогенеза. Ранее была показана связь между уровнем ЛНП-ЦИК и толщиной интима-медиального слоя аорты (ТИМС). Установлено, что даже низкие уровни ЛНП-ЦИК способны предсказывать отсутствие утолщения ТИМС. Разработка и совершенствование моделей для прогнозирования тяжести атеросклероза является важной задачей для ранней профилактики этого заболевания.

Целью данной работы является создание математических моделей на основе машинного обучения, способных прогнозировать атерогенетические изменения у человека на временном промежутке от трех месяцев до года, с использованием простых диагностических показателей. Для исследования мы использовали выборку из 101 пациента-мужчины в возрасте от 37 до 74 лет с бессимптомным течением атеросклероза на момент первичного обследования. У субъектов измерялось более 30 морфо-анатомических, физиологических и биохимических показателей, которые затем были использованы в качестве предикторов для предсказательной модели.

Толщина интима-медиального слоя сонной артерии измерялась у каждого пациента на начальном этапе исследования, а также через 3, 6, 9 и 12 месяцев. На каждом этапе определялся статус пациента («норма», «предрасположенность», «атеросклероз») по критериям Американского общества эхокардиографов [1, 2]. С помощью языка программирования Python и модуля sklearn строились прогностические регрессионные модели зависимости статуса здоровья от возраста пациента и уровня концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), а также только от концентрации ЦИК в крови на начальном этапе.

1. Модель логистической регрессии с алгоритмом кросс-валидации.
2. Модель логистической регрессии с разделением выборок в соотношении 3 : 1.
3. Модель деревьев решений.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-65-00027).

© Н. А. Орехов, Д. Д. Бородко, Е. М. Плешко, А. В. Омельченко, 2024

Аналогичные модели строились для прогноза ухудшения статуса здоровья (возникновение предрасположенности к атеросклерозу у здоровых пациентов и развитие атеросклероза у предрасположенных). Для каждой модели проводился ROC-анализ, а также оценивались показатели правильности, неправильности, точности, чувствительности, F-Score и специфичности для выбора наилучшей модели.

В результате работы были созданы математические модели, способные с высокой точностью предсказывать развитие атеросклероза у пациентов на основании их возраста и уровня ЦИК в крови в период от 3 месяцев до года. Интересно, что ни возраст, ни уровень ЦИК в крови по отдельности не являются надежными прогностическими факторами, однако их совместное использование в моделях обеспечивает необходимую точность и специфичность. Наиболее эффективным методом оказался алгоритм на основе дерева решений, продемонстрировавший специфичность 98,9 %, точность 94,1 % и AUC 81,6 % для прогноза атеросклероза на полугодовой период.

Литература

1. Groot de E., Leuven van S. I., Duivenvoorden R. et al. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2008. Vol. 5. P. 280–288.

2. Stein J. H., Korcarz C. E., Hurst R. T. et al. American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine // J. Am. Soc. Echocardiogr. 2008. Vol. 21. P. 93–111.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-33

МУЛЬТИОМИКА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК РАСКРЫВАЕТ ЗАВИСЯЩИЕ ОТ СТАДИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА В ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ *

SINGLE-CELL MULTI-OMICS REVEAL STAGE-DEPENDENT PATTERNS OF IMMUNE RESPONSE GENE EXPRESSION IN NORMAL AND ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA HUMAN ERYTHROID CELLS

Р. Ю. Перик-Заводский[1], О. Ю. Перик-Заводская[1], Ю. А. Шевченко[1], М. О. Волынец[1], С. Алрхмун[1], В. В. Денисова[2], С. В. Сенников[1]

[1]НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск
[2]Клиника иммунопатологии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

R. Y. Perik-Zavodskii[1], O. Y. Perik-Zavodskaia[1], Y. A. Shevchenko[1], M. O. Volynets[1], S. Alrhmoun[1], V. V. Denisova[2], S. V. Sennikov[1]

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

✉ zavodskii.1448@gmail.com

Аннотация

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) оказывает подавляющее воздействие на все популяции клеток костного мозга, в том числе на эритроидные ядросодержащие клетки — предшественники эритроцитов с иммунорегуляторными свойствами [1]. Для детального изучения механизмов влияния ОЛЛ на эритроидные ядросодержащие клетки мы провели анализ иммунного транскриптома и поверхностного протеома методом мультиомики единичных мононуклеарных клеток костного мозга на платформе BD Rhapsody. Мы обнаружили, что при ОЛЛ в поздних эритроидных ядросодержащих клетках повышается экспрессия гена *MBZ1* и понижается экспрессия гена *S100A9*.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) exerts a suppressive effect on all bone marrow cell populations, including erythroid nucleated cells, the precursors of red blood cells with immunoregulatory properties [1]. To study in detail the mechanisms of the influence of ALL on erythroid nucleated cells, we analyzed the immune transcriptome and surface proteome using the multi-omics method of single bone marrow mononuclear cells on the BD Rhapsody platform. We found that in ALL, the expression of the *MBZ1* gene increases and the expression of the *S100A9* gene decreases in late erythroid nucleated cells

Цель — определение иммунотранскриптомного (397 генов) и иммунопротеомного (28 поверхностных белков) профиля единичных мононуклеарных клеток костного мозга в норме (n = 4) и при ОЛЛ (n = 3).

Материалы и методы

Из суспензии клеток костного мозга методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll были выделены мононуклеарные клетки. Мононуклеарные костного мозга были помечены антителами с молекулярными штрихкодами для мультиплексирования Sample Tag и 28 AbSeq и загружены в станцию для мультиомного профилирования BD Rhapsody Express, в которой было произведено добавление улавливающих поли-А-молекулы металлических бус с молекулярными штрихкодами, лизис клеток и гибридизация поли-А-молекул лизированных клеток с металлическими бусами. Поли-А-молекулы затем были обратно транскрибированы с получением кДНК; кДНК была амплифицирована в двух раундах полугнездовой и одном раунде гнездовой ПЦР с целью получения финальных библиотек иммунного транскриптома, AbSeq и Sample Tag. Полученные библиотеки были пулированы и секвенированы на приборе Novaseq 6000 (50PE, S1 проточная кювета).

Полученные FASTQ-файлы были обработаны при помощи пайплайна BD версии 1.10.1 с целью получения финальных матриц экспрессии генов. Матрицы экспрессии генов были проанализированы в пакете Seurat V5 язы-

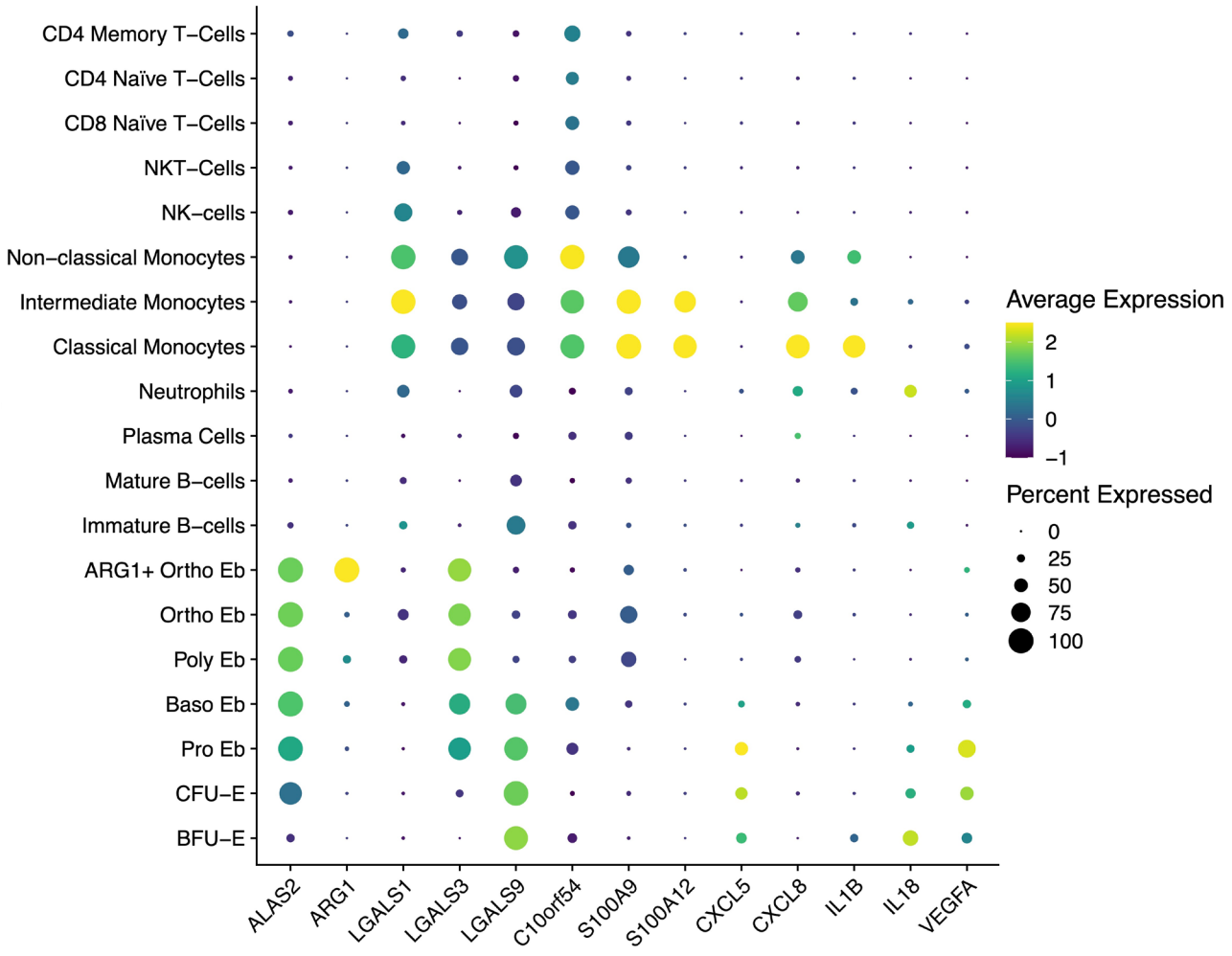
* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования (государственное задание № 0415-2024-0012).

© Р. Ю. Перик-Заводский, О. Ю. Перик-Заводская, Ю. А. Шевченко, М. О. Волынец, С. Алрхмун, В. В. Денисова, С. В. Сенников, 2024

ка программирования R. Для этого матрицы экспрессии генов и белков были подвергнуты процедуре контроля качества и объединены. Затем для объединенных матриц генов и белков были найдены наиболее вариабельные по экспрессии гены и белки. Объединенная матрица генов была нормализована при помощи пакета SCTransform языка программирования R с учетом выбранных вариабельных генов. Объединенная матрица белков была нормализована при помощи метода Centered Log-ratio. Для нормализованных матриц генов и белков было произведено снижение размерности PCA (анализ главных компонент), произведена коррекция эффекта партии при помощи пакета Harmony языка программирования R, произведено мультиомное снижение размерности WNN UMAP на 28 скорректированных при помощи Harmony главных компонентах экспрессии генов и на 18 скорректированных при помощи Harmony главных компонентах экспрессии белков. Затем для исследуемых клеток были найдены кластеры, которые соответствовали популяциям клеток костного мозга. Для эритроидных ядросодержащих клеток была проведена внутрикластерная дифференциальная экспрессия генов при помощи теста Уилкоксона с критериями биологической и статистической значимости log2(Fold Change) > 0,847 или log2(Fold Change) < −0,847 и q-value < 0,005.

Результаты

В эритроидных ядросодержащих клетках нами была обнаружена экспрессия миелоидных генов *C10orf54, CXCL5, CXCL8, IL1B, LGALS1, LGALS3, LGALS9, S100A9* и *VEGFA*, которые были обогащены в терминах Gene Ontology Biological Process, связанных с антибактериальным ответом, и экспрессия которых ранее была обнаружена в классических моноцитах. При ОЛЛ в поздних эритроидных ядросодержащих клетках (базофильных и ортохроматофильных эритробластах) была повышена экспрессия гена *MBZ1* и понижена экспрессия гена *S100A9* в сравнении с поздними эритроидными ядросодержащими клетками костного мозга здоровых доноров (см. рисунок).



Точечный график миелоидных/антимикробных генов эритроидных клеток на различных стадиях дифференцировки в сравнении с другими популяциями костного мозга. *Фиолетовый цвет* обозначает минимальную экспрессию гена, *желтый* — максимальную. Размер точки отражает процент клеток, экспрессирующих ген

Выводы

Нами была обнаружена экспрессия миелоидных генов, связанных с антибактериальным ответом и свойственных классическим моноцитам, что позволяет говорить о роли эритроидных клеток во врожденном иммунитете. Снижение же экспрессии гена *S100A9* в поздних эритроидных клетках при ОЛЛ позволяет предположить снижение антимикробной функции эритроидных клеток при ОЛЛ, так как ген *S100A9* является частью димера белка Кальпротектина, имеющего противомикробную активность [2].

Литература

1. Perik-Zavodskii R., Perik-Zavodskaia O., Shevchenko J. et al. A subpopulation of human bone marrow erythroid cells displays a myeloid gene expression signature similar to that of classic monocytes // PloS one. 2024. Vol. 19 (7). P. e0305816.

2. Perik-Zavodskaia O., Perik-Zavodskii R., Nazarov K. et al. Murine Bone Marrow Erythroid Cells Have Two Branches of Differentiation Defined by the Presence of CD45 and a Different Immune Transcriptome Than Fetal Liver Erythroid Cells // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24 (21). P. 15752.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-34

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С НОРМАЛЬНОЙ И ДЕФЕКТНОЙ МИТОФАГИЕЙ *

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF CELL LINES WITH NORMAL AND DEFECTIVE MITOPHAGY

Е. М. Плешко, Д. Д. Бородко, Н. А. Орехов, А. В. Омельченко

НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва

E. M. Pleshko, D. D. Borodko, N. A. Orekhov, A. V. Omelchenko

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

✉ lizapleshko@yandex.ru

Аннотация

Поиск генов, участвующих в регуляции митофагии, — перспективное направление в противовоспалительной терапии. Мы провели транскриптомный анализ клеточных линий с нормальной и дефектной митофагией и выявили 7 дифференциально экспрессирующихся генов. Они контролируют ряд важных процессов, в том числе клеточную коммуникацию, и могут являться регуляторами митофагии.

Abstract

The search for genes involved in the regulation of mitophagy is a promising direction in anti-inflammatory therapy. We performed a transcriptomic analysis of cell lines with normal and defective mitophagy and identified 7 differentially expressed genes. They control a number of important processes, including cellular communication, and can be regulators of mitophagy.

Введение. Нарушение митофагии приводит к накоплению в клетках поврежденных митохондрий и может являться причиной ряда воспалительных заболеваний, в том числе атеросклероза. Этот процесс активно исследуется, однако сведения о мастер-регуляторах, запускающих митофагию, на данный момент неполные. Также нет четкого представления о том, какие метаболические и сигнальные пути изменяются в условиях дефектной митофагии. Уточнение этих данных может пролить свет на механизмы развития воспалительной реакции и способствовать поиску новых мишеней для противовоспалительной терапии.

Методы. Для работы было взято 13 цибридных клеточных линий с нормальной и дефектной митофагией, полученных слиянием линии ρ0 THP-1 с тромбоцитами пациентов, у которых был диагностирован атеросклероз. Мы оценили уровень митофагии в них с помощью стимуляции FCCP и провели транскриптомный анализ образцов до стимуляции с тремя биологическими повторностями.

Для анализа качества чтений была использована программа FastQC (v0.12.1). Для триммирования использовалась программа Trimmomatic (v0.39). С помощью алгоритма STAR (v2.7.0a) чтения были картированы на сборку человеческого генома GRCh38 с аннотацией ensembl и были получены каунты. Далее мы провели анализ дифференциальной экспрессии генов с помощью пакета DESeq2 (1.12.3) на языке R и анализ функционального обогащения с помощью ClusterProfiler (v3.19).

Результаты. Мы идентифицировали 63 гена, экспрессия которых статистически значимо отличается при нормальной и дефектной митофагии (p-value < 0,05). Только у 7 из них экспрессия была повышена или понижена более чем в 4 раза (|log2FoldChange| > 2). Всего один ген (PCDH7), удовлетворяющий данным криетриям, был даунрегулирован в условиях дефектной митофагии по сравнению с нормальной. Остальные апрегулированы: GPC6, RENBP, RGMA, NEUROG3, LGALS3BP и MPDZ. Из-за малого количества статистически значимых генов не удалось выявить обогащение метаболических путей в данном наборе.

Протокадгерин-7 (продукт PCDH7) участвует в регуляции клеточной коммуникации и адгезии. Было показано, что его нокдаун вызывает изменения в аутофагии [1]. Ренин-связывающий белок является компонентом ренин-ангиотензиновой системы. Для генов PRR и ACE2, также входящих в эту систему, показано участие в регуляции аутофагии [2]. Функция галектин-3-связывающего белка (продукт LGALS3BP) неизвестна, но галектин-3 регулирует ряд клеточных процессов. Было показано, что его даунрегуляция стимулирует митофагию [3]. Для остальных генов связь с аутофагией на данный момент неизвестна, но они участвуют в регуляции ряда кле-

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-65-10014).

© Е. М. Плешко, Д. Д. Бородко, Н. А. Орехов, А. В. Омельченко, 2024

точных процессов и могут в том числе являться мастер-регуляторами митофагии. GPC6 вовлечен в контроль клеточного роста и деления, RGMA регулирует формирование костей, NEUROG3 является транскрипционным фактором, контролирующим пролиферацию эндокринных клеток-предшественников. Функция MPDZ неизвестна, но показано, что он взаимодействует с важными регуляторными белками из класса транскрипционных факторов.

Выводы. Мы выявили 7 генов, статистически значимо изменивших экспрессию при нарушении процесса митофагии. Некоторые из них действительно могут объяснять имеющиеся нарушения при болезнях хронического воспаления, однако механизмы, связывающие эти гены, остаются неясными и требуют дополнительных исследований в контексте контроля митофагии и патологий.

Литература

1. Liu Z. et al. PCDH7 knockdown potentiates colon cancer cells to chemotherapy via inducing ferroptosis and changes in autophagy through restraining MEK1/2/ERK/c-Fos axis // Biochemistry and Cell Biology. 2022. Vol. 100, No. 6. P. 445–457.

2. Zhang X.Y. et al. Downregulation of the (pro) renin receptor alleviates ferroptosis-associated cardiac pathological changes via the NCOA 4-mediated ferritinophagy pathway in diabetic cardiomyopathy // International Immunopharmacology. 2024. Vol. 138. P. 112605.

3. Huang Z. et al. Galectin-receptor interaction: a key player in liver fibrosis induced by Schistosoma japonicum infection // Parasites & Vectors. 2024. Vol. 17, No. 1. P. 232.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-35

ПРОГРАММА RATAT ДЛЯ ОБРАБОТКИ И АНАЛИЗА ЭЛЕКТРОКОРТИКОГРАММЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ *

RATAT PROGRAM FOR PROCESSING AND ANALYZING ELECTROCORTICOGRAMS OF LABORATORY ANIMALS

А. А. Ребик

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

A. A. Rebik

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, Moscow

✉ rebik_anastasiya@mail.ru

Аннотация

Программа RatAt, разработанная для анализа ЭКоГ, позволяет использовать преимущества современного анализа электрической активности мозга без знания Python. В программе реализованы частотно-временной анализ, анализ спектров мощности и амплитуды, вейвлет-анализ и анализ апериодической активности, фильтрация и удаления сердечной активности из записей электрических активностей мозга и мышц. Обработка записей ЭКоГ и основные инструменты анализа электрической активности реализованы с помощью библиотек MNE, FooF и SciPy.

Abstract

The RatAt program, developed for ECoG analysis, allows you to analyze and take advantage of modern analysis of electrical activity of the brain without knowledge of Python. The program implements time-frequency analysis, analysis of power and amplitude spectra, wavelet analysis and analysis of aperiodic activity, filtration and removal of cardiac activity from recordings of electrical activity of the brain and muscles. The processing of Ecg recordings and the main tools for analyzing electrical activity are implemented using the MNE, FooF and SciPy libraries.

Электрокортикография (ЭКоГ) измеряет генерируемые групповой нейронной активностью электрические сигналы с поверхности коры головного мозга. Использование этих сигналов для характеристики и локализации нейронной активации в головном мозге — сложная задача, требующая знаний в области физики, обработки сигналов, статистики и численных методов. Нами была разработана программа для анализа ЭКоГ RatAt [1], которая позволяет закрыть часть задач, используя графический интерфейс, предоставляя возможность пользователю без знания языка программирования пользоваться инструментами анализа ЭКоГ крыс. На данный момент не существует общедоступной программы с графическим интерфейсом, ориентированным на удобство пользователя. В программе реализован частотно-временной анализ, анализ спектров мощности и амплитуды, вейвлет-анализ и анализ апериодической активности. Программа реализована на языке программирования Python 3.12. Обработка записей ЭКоГ (выделение и удаление из анализа артефактов, фильтрация, выделение целевых участков) и основные инструменты анализа электрической активности (частотно-временной анализ, анализ спектров мощности и амплитуды, вейвлет-анализ) реализованы с помощью библиотеки для анализа MNE [2]. MNE-Python представляет собой пакет программного обеспечения с открытым исходным кодом, предоставляет современные алгоритмы реализованные на Python, которые охватывают множество методов предварительной обработки данных, локализации источников, статистического анализа и оценки функциональных связей между распределенными областями мозга. Для анализа непериодической активности используется библиотека FoooF [3], предназначенная для работы с 1/f-подобными (апериодическими) компонентами сигнала и компонентами периодического сигнала внутри спектров мощности ЭКоГ [4]. Также в программе реализован разработанный нами метод спектрально-кластерного анализа электрофизиологических методов, позволяющий обнаруживать, фильтровать и подготавливать к анализу электрическую активность сердца [5].

Для реализации вспомогательных функций при анализе ЭКоГ использовались следующие библиотеки: SciPy, Matplotlib, Pandas, Numpy, Openpyxl, Edflib-Python. Графический интерфейс реализован при помощи библиотеки PyQt6.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки РФ (государственное задание № 007-00135-16-03).

© А. А. Ребик, 2024

Программа позволяет пользователю без знания языка программирования Python располагать современными инструментами математического анализа ЭКоГ крыс. Все инструменты. представленные в данной программе, реализованы с учетом особенностей работы с лабораторными животными и позволяют выстроить оптимальный алгоритм работы с сигналами. Планируется расширить набор инструментов в зависимости от потребностей пользователей.

Литература

1. Программа RatAt. URL: https://github.com/RebikAnastasiya/RatAt.

2. MNE open-source Python package for exploring, visualizing, and analyzing human neurophysiological data: MEG, EEG, sEEG, ECoG, NIRS, and more. URL: https://mne.tools/stable/index.html.

3. FOOOF — fitting oscillations & one over f. URL:https://fooof-tools.github.io/fooof/.

4. Donoghue T., Haller M., Peterson E. J. et al. Parameterizing neural power spectra into periodic and aperiodic componentsn // Nature Neuroscience. 2020. Vol. 23. P. 1655–1665.

5. Ребик А. А., Бикчентаева Л. М., Яфарова Г. Г. Новый подход в диагностике мышечного тремора: выявление кардио-баллистического компонента с применением спектрально-кластерного анализа // РКЖ. 2021. № S5.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-36

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ АЛГОРИТМОВ ПОИСКА ПРОФАГОВ В БАКТЕРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ *

COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOINFORMATIC ALGORITHMS FOR SEARCHING FOR PROFAGES IN THE BACTERIAL GENOME

А. В. Резайкин[1,2], П. В. Микушин[1,3], И. Г. Низовцева[1],
А. А. Чигирева[4], В. И. Дубова[4], А. Е. Глебова[1]

[1] *Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург*
[2] *Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург*
[3] *Московский физико-технический институт*
[4] *ООО «НПО Биосинтез», Москва*

A. V. Rezaykin[1,2], P. V. Mikushin[1,3], I. G. Nizovtseva[1],
A. A. Chigireva[4], V. I. Dubova[4], A. E. Glebova[1]

[1] *Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg*
[2] *Ural State Medical University, Yekaterinburg*
[3] *Moscow Institute of Physics and Technology*
[4] *NPO Biosintez Ltd, Moscow*

✉ pavel.m.sci@gmail.com

Аннотация

В работе проведен сравнительный анализ четырех инструментов для идентификации профагов: PHASTEST, Phigaro, VIBRANT и PhiSpy. С помощью инструментов, основанных на разных алгоритмах (поиске гомологии, машинном обучении или их комбинации), были проанализированы полные геномы трех штаммов *Methylococcus capsulatus*. Результаты выявили существенные расхождения в определении границ, количества генов и функционального состояния предсказанных профагов. Анализ полученных данных показал, что использование нескольких инструментов с различными алгоритмами позволяет получить более точную информацию о профагах и снизить количество ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

Abstract

This study presents a comparative analysis of four prophage prediction tools: PHASTEST, Phigaro, VIBRANT, and PhiSpy. The complete genomes of three Methylococcus capsulatus strains were analyzed using these tools, which employ distinct algorithms based on homology searches, machine learning, or a combination of both approaches. The results revealed significant discrepancies in prophage boundary prediction, gene content, and functional assessment. This analysis highlights that utilizing multiple tools with complementary algorithms enhances the accuracy of prophage identification and minimizes both false-positive and false-negative predictions.

Бактериофаги — неотъемлемый компонент микробных экосистем, оказывающий влияние на динамику бактериальных сообществ, метаболизм хозяев и горизонтальный перенос генов [1]. Высокопроизводительное секвенирование позволило изучать фаги без культивирования *in vitro*. Однако отсутствие универсальных генов-маркеров у вирусов затрудняет идентификацию их последовательностей в метагеномных данных. Для решения этой проблемы разработаны инструменты, дифференцирующие вирусные и невирусные последовательности, в том числе профаги в бактериальных геномах [2]. Различия в алгоритмах этих инструментов приводят к неоднозначности результатов, поэтому важна сравнительная оценка их эффективности.

В данном исследовании проведено сравнение четырех инструментов для поиска профагов — PHASTEST (v. 2.3.0) [3], Phigaro (v. 2.4.0) [4], VIBRANT (v. 1.2.0) [5] и PhiSpy (v. 4.2.21) [6], — основанных на различных алгоритмах.

Первоначально все представленные программы определяют протеин-кодирующие гены с помощью prodigal [7]. Далее гены аннотируются как бактериальные, вирусные или неизвестные. PHASTEST идентифицирует фаговые белки путем поиска гомологии с последовательностями в вирусной базе данных RefSeq (NCBI) [3]. В Phigaro реализован аналогичный подход, но с использованием базы данных профилей скрытых марковских

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-24-00454).
© А. В. Резайкин, П. В. Микушин, И. Г. Низовцева, А. А. Чигирева, В. И. Дубова, А. Е. Глебова, 2024

моделей (HMM) — prokaryotic Virus Orthologous Groups (pVOGs) [4, 8]. PhiSpy использует метод случайного леса. Программа вычисляет набор признаков (длина белка, направленность цепи транскрипции, соотношение AT/GC, частота встречаемости уникальных фаговых слов (определенная последовательность из 12 п. н.), сайты интеграции фагов), на основе которых модель определяет вероятность их фаговой природы [6]. VIBRANT реализует гибридный подход, комбинируя нейронные сети с поиском гомологии [5]. В Phigaro при поиске гомологии используются профили HMM, но из трех различных баз данных: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [9], Pfam [10] и Virus Orthologous Groups (VOG) [11].

В итоге потенциальные профаговые гены объединяются в профаговые регионы. При объединении все программы учитывают количество потенциальных генов, расположенных на определенной дистанции, а также дополнительные характеристики. Найденным регионам дается интегральная оценка (score).

Для сравнительного анализа использовали полные геномы трех штаммов *Methylococcus capsulatus (Bath, IO1, Mc7)*, доступные в GenBank (acc. numb. NC_002977, CP079098, CP079095). Результаты включали координаты профаговых регионов, бактериальные и фаговые гены (ORF) внутри них, а также оценку функционального состояния профагов (см. таблицу).

Результаты поиска профаговых последовательностей в геномах штаммов *Methylococcus capsulatus*

Программа	Регион п/п	Размер региона (kb)	Всего ORF в регионе (характерных для профага)	Положение региона в геноме
str. Bath (NC_002977)				
PHASTEST	1	53.3	51 (31)	2819754–2873113
	2	48.9	59 (42)	3093885–3142838
Phigaro	1	50.0	50 (35)	2824960–2874998
	2	45.8	63 (48)	3092748–3138558
VIBRANT	1	61.4	61 (30)	2816780–2878183
	2	50.0	67 (38)	3091049–3141096
PhiSpy	1	31.8	27	2820020–2851790
	2	32.3	40	3096072–3128377
str. IO1 (CP079098)				
PHASTEST	1	48.5	62 (45)	2508110–2556599
Phigaro	1	17.5	15 (9)	104180–121683
	2	50.6	68 (51)	2509623–2560215
VIBRANT	1	8.3	13 (3)	830933–839256
	2	57.5	75 (32)	2512440–2569933
PhiSpy	1	12.3	19	827273–839561
	2	39.5	54	2514897–2554412
str. Mc7 (CP079095)				
PHASTEST	1	25.4	18 (7)	1825683–1851097
Phigaro	*Профагов не обнаружено*			
VIBRANT	*Профагов не обнаружено*			
PhiSpy	1	33.3	40	938889–972163
	2	16.5	24	1444321–1460832
	3	19.9	24	1629311–1649204
	4	17.6	12	2001894–2019505
	5	14.8	20	2542546–2557313

В геноме штамма Bath все инструменты выявили два потенциально жизнеспособных профага. Их расположение совпадало, но наблюдались различия в границах, размере и количестве генов, обусловленные, вероятно, аннотацией пограничных генов с неизвестными функциями. В геноме штамма IO1 все программы обнаружили один общий профаг (2508110–2569933 нт). Phigaro, VIBRANT и PhiSpy идентифицировали дополнительный регион (совпадающий у последних двух). В штамме Mc7 только PhiSpy предсказал пять потенциальных профагов. Регионы 2–5, вероятно, ложноположительные из-за малого размера и числа генов. Первый регион, отличающийся большим размером и количеством ORF, может представлять собой новый, неописанный бактериофаг, что требует дальнейшего исследования.

Для повышения точности идентификации профагов в бактериальных геномах рекомендуется использовать комбинацию инструментов с разными алгоритмами. При оценке результатов важно учитывать размер найденных регионов, количество фаговых генов и особенности алгоритмов. Определение границ профагов следует проводить с учетом аннотаций пограничных генов, полученных разными методами.

Литература

1. Hegarty B., Riddell V. J., Bastien E. et al. Benchmarking informatics approaches for virus discovery: caution is needed when combining in silico identification methods // mSystems. 2024 Vol. 9 (3). P. e0110523.

2. Andrade-Martínez J. S., Camelo V. L. C., Chica C. L. A. et al. Computational Tools for the Analysis of Uncultivated Phage Genomes // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2022. Vol. 86 (2). P. e0000421.

3. Wishart D. S., Han S., Saha S. et al. PHASTEST: faster than PHASTER, better than PHAST // Nucleic Acids Res. 2023. Vol. 51 (W1). P. W443–W450.

4. Starikova E. V., Tikhonova P. O., Prianichnikov N. A. et al. Phigaro: high-throughput prophage sequence annotation // Bioinformatics. 2020. Vol. 36 (12). P. 3882–3884.

5. Kieft K., Zhou Z. Anantharaman K. VIBRANT: automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences // Microbiome. 2020. Vol. 8 (1). P. 90.

6. Akhter S., Aziz R. K., Edwards R. A. PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies // Nucleic Acids Res. 2012. Vol. 40 (16). P. e126.

7. Hyatt D., Chen G. L., LoCascio P. F. et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification // BMC Bioinformatics. 2010. Vol. 11. P. 119

8. Grazziotin A. L., Koonin E. V., Kristensen D. M. Prokaryotic Virus Orthologous Groups (pVOGs): a resource for comparative genomics and protein family annotation // Nucleic Acids Res. 2017. Vol. 45 (D1). P. D491–D498.

9. Kanehisa M., Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res. 2000. Vol. 28 (1). P. 27–30.

10. El-Gebali S., Mistry J., Bateman A. et al. The Pfam protein families database in 2019 // Nucleic Acids Res. 2019. Vol. 47 (D1). P. D427–D432.

11. Trgovec-Greif L., Hellinger H.-J., Mainguy J. et al. VOGDB — Database of Virus Orthologous Groups // Viruses. 2024. Vol. 16. P. 1191.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-37

ТЕРНИСТЫЙ ПУТЬ К РЕКОНСТРУКЦИИ И АНАЛИЗУ МУТАЦИОННЫХ СПЕКТРОВ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ ПРОКАРИОТ *

THE ROCKY ROAD TO AEROBIC AND ANAEROBIC PROKARYOTES MUTATIONAL SPECTRA RECONSTRUCTION AND ANALYSIS

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

[1] *Центр геномных исследований, Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград*
[2] *Манчестерский университет, Великобритания*

A. V. Skudnov[1], E. A. Badamshin[1], V. V. Lobanova[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*

✉ konstantinpopadin@gmail.com

Аннотация

В нашей работе мы представляем надстройку к пайплайну NeMu [1] для автоматизированного построения мутационных спектров видов бактерий. В данной работе мы строим и сравниваем мутационные спектры аэробных и анаэробных прокариот. Обнаруженные частоты могут быть специфичны для исследуемой клады, либо являются общими для аэробов и анаэробов. Мы рассматриваем нейтральные мутационные спектры, то есть только синонимичные полиморфизмы в третьих позициях кодонов, влияние отбора на которые минимально. Это позволяет оценить влияние стрессовых факторов, таких как активные формы кислорода, на ДНК бактерий.

Abstract

In our work, we present an adaptation of the NeMu Pipeline [1] for automated construction of mutational spectra of bacterial species. In this work, we construct and compare mutational spectra of aerobic and anaerobic prokaryotes. The frequencies detected may be specific to the clade under study, or they may be common to aerobes and anaerobes. We consider neutral mutational spectra, that is, only synonymous polymorphisms in the third positions of codons, the influence of selection on which is minimal. This allows us to assess the influence of stress factors, such as reactive oxygen species, on bacterial DNA.

GC-состав генома бактерий связан с концентрацией кислорода в окружающей среде: более высокий уровень кислорода соответствует большей доли нуклеотидов G и C. Кроме того, GC-состав метагеномов океанических бактерий неравномерно распределен по глубине и коррелирует с уровнем кислорода на соответствующих глубинах. Естественно предположить, что мутационный спектр существенным образом влияет на GC-состав и частоты мутаций [2].

Для проверки этого предположения мы провели объединение двух баз данных — AnnoTree [3], содержащей филогенетику и таксономию GTDB, и JGI GOLD [4], содержащей экологические аннотации видов с таксономией NCBI. Мы провели идентификацию ортологий генов бактерий из GTDB с помощью базы данных KEGG Ortology [5] и построили мутационные спектры для каждого гена. Далее они были нормализованы и объединены для получения общего мутационного спектра видов выбранных облигатных аэробных и анаэробных прокариот (см. рисунок).

Мы провели внутривидовое выравнивание последовательностей ортологичных генов, рассчитали внутривидовые филогении и реконструировали предковые последовательности в каждом внутреннем узле, чтобы использовать эти реконструкции при построении мутационных спектров. Это было сделано с помощью ранее разработанного в нашей лаборатории пайплайна NeMu [1]. Этот пайплайн позволяет из выравнивания последовательностей генов и восстановленных предковых последовательностей построить мутационный спектр, рассматривая синонимичные полиморфизмы, в нашем случае локализованные в третьих позициях кодонов, т. е. преимущественно нейтральные мутации. Насколько нам известно, это единственный пайплайн, позволяющий получать мутационные спектры на основании сравнительно-геномных данных.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 21-75-20143).

© А. В. Скуднов, Э. А. Бадамшин, В. В. Лобанова, Б. Э. Ефименко, К. В. Гунбин, К. Ю. Попадьин, С. В. Денисов, 2024

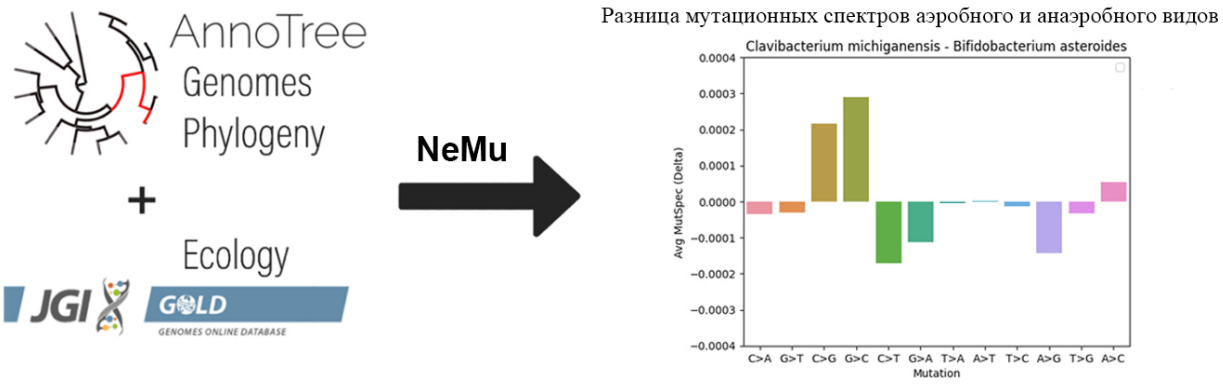


Схема проведения эксперимента. На гистограмме положительные значения отражают перевес частот мутирования в сторону аэроба *Clavibacterium michiganensis*, отрицательные — в сторону анаэроба *Bifidobacterium asteroids* (Аэроб — Анаэроб)

В качестве пилотного сравнения мы восстановили мутационные спектры для двух видов, различающихся по аэробному статусу и находящихся на соседних ветках филогенетического дерева: *Clavibacter michiganensis* (аэроб) и *Bifidobacterium asteroides* (анаэроб). Мутационные спектры этих двух видов существенно различаются. Наиболее контрастной является повышенная частота G>C- и C>G-мутаций у аэроба *C. michiganensis* по сравнению с анаэробом *B. asteroides*. Мы работаем над тем, чтобы расширить этот подход на все дерево бактерий, чтобы можно было сделать выводы, являются ли наблюдаемые различия общими для всех аэробов и анаэробов или являются только видоспецифическими характеристикам.

В целом в данной работе мы представили эволюционный взгляд на факторы, формирующие мутационные спектры двух экологически контрастных групп прокариот. Более того, мы представляем потенциально более быстрый и дешевый биоинформатический метод проведения экспериментов по накоплению мутаций на природных линиях.

Литература

1. Efimenko B., Popadin K., Gunbin K. NeMu: a comprehensive pipeline for accurate reconstruction of neutral mutation spectra from evolutionary data // Nucleic Acids Research. 2024. No. W1 (52). P. W108–W115.

2. Naya H., Romero H., Zavala A. et al. Aerobiosis Increases the Genomic Guanine Plus Cytosine Content (GC%) in Prokaryotes // Journal of Molecular Evolution. 2002. No. 55. P. 260–264.

3. Mendler K., Chen H., Parks D. H. et al. AnnoTree: visualization and exploration of a functionally annotated microbial tree of life // Nucleic Acids Research. 2019. No. 9 (47). P. 4442–4448.

4. Mukherjee S., Stamatis D., Bertsch J. et al. Genomes OnLine database (GOLD) v.7: updates and new features // Nucleic acids research. 2018. No. 47.

5. Dunlap W., Starcevic A., Baranašić D. et al. KEGG orthology-based annotation of the predicted proteome of Acropora digitifera: ZoophyteBase — an open access and searchable database of a coral genome // BMC Genomics. 2013. No. 14. P. 509.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-38

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕГМЕНТОВ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В ГЕНОМЕ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ GBS*

IDENTIFICATION OF INTROGRESSIVE HYBRIDIZATION SEGMENTS IN THE WHEAT GENOME USING GBS

Н. М. Съедина[1], А. С. Ермолаев[1], Д. С. Ульянов[1], В. С. Воронежская[1,2], А. В. Васильев[1], С. В. Тощаков[3], М. Г. Дивашук[1]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии, НИЦ «Курчатовский институт», Обнинск
[3]Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

N. M. Syedina[1], A. S. Ermolaev[1], D. S. Ulyanov[1], V. S. Voronezhskaya[1,2], A. V. Vasiliev[1], S. V. Toshchakov[3], M. G. Divashuk[1]

[1]All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow
[2]All-Russia Research Institute of Radiology and Agroecology, National Research Centre "Kurchatov Institute"
[3]National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow

✉ nadi.sn@yandex.ru

Аннотация

В работе представлен подход для количественной оценки содержания геномного материала родителей в геноме потомков на основании данных секвенирования GBS. Кроме того, метод позволяет оценить распределение материала родителей в геноме потомков и идентифицировать точки рекомбинации и хромосомные перестройки. Количественная оценка позволяет сделать вывод о вкладе каждого родителя в геном потомка, что важно для селекционного процесса при бэкроссировании и интрогрессионной селекции для минимизации количества генетического материала одного из родителя в потомках.

Abstract

This study presents an approach for quantitative assessment of the content of parental genomic material in the offspring genome based on GBS sequencing data. In addition, the method allows for assessing the distribution of parental material in the offspring genome and identifying recombination points and chromosomal rearrangements. Quantitative assessment allows drawing a conclusion about the contribution of each parent to the offspring genome, which is important for the breeding process in backcrossing and introgression selection to minimize the amount of genetic material of one parent in the offspring.

Интрогрессивная гибридизация играет важную роль в современной селекции, однако для создания новых сортов важно как можно полнее убирать генетический материал донора из генома реципиента (за исключением целевого участка). Количественная оценка остатков генетического материала донора в геноме реципиента является сложной задачей, особенно для мягкой пшеницы, геном которой составляет 16 Gbp. Еще более сложной задачей является оценка распределения генетического материала донора по геному из-за рекомбинации, которая уменьшает остаточные фрагменты генома донора из поколения в поколение. Одним из наиболее часто используемых методов для оценки генетического материала родителей в материале потомков является геномная *in situ* гибридизация (GISH), однако этот метод имеет ряд ограничений, таких как высокая стоимость, низкая производительность и разрешающая способность. Разработка подхода для оценки содержания и распределения генетического материала родителей в геноме потомков на основании GBS позволяет проводить одновременный анализ большого количества образцов, что значительно повышает производительность и значительно увеличивает разрешающую способность.

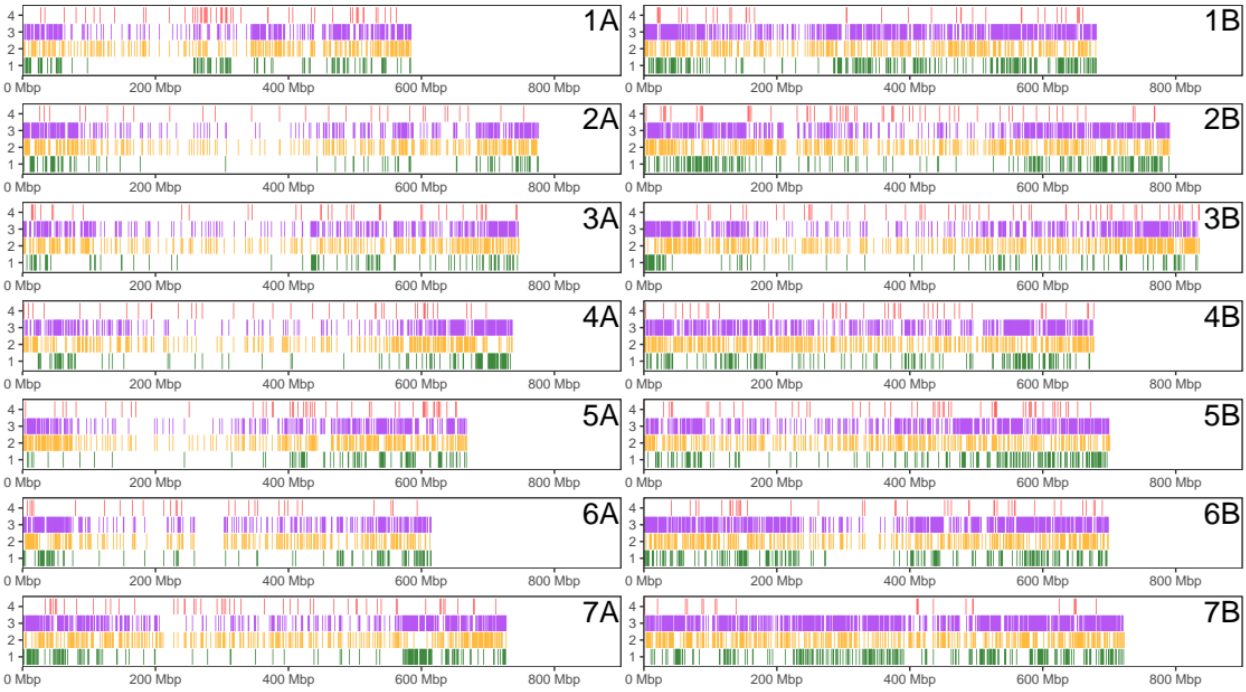
В проведенном исследовании для анализа принадлежности полиморфные SNP родителей и потомка в каждом сегменте генома мягкой и твердой пшеницы длиной 1 Mbp были использованы для построения филогенетического дерева для сегмента. Принадлежность сегмента в геноме потомка к одному из геномов родителей определялась на основе филогенетической дистанции между потомком и родителями. Подобный подход ранее никогда не проводился на растениях, а в литературе встречается лишь один пример его использования на малярийных

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-16-00274).

© Н. М. Съедина, А. С. Ермолаев, Д. С. Ульянов, В. С. Воронежская, А. В. Васильев, С. В. Тощаков, М. Г. Дивашук, 2024

комарах рода *Anopheles* [1]. Использование его на мягкой пшенице может быть осложнено из-за аллополиплоидной структуры генома, которая может привести к высокой гетерозиготности.

Для оценки возможности применения подхода на геноме мягкой и твердой пшеницы нами были секвенированы расщепляющиеся популяции — линии-потомки с поздних поколений самоопыления, а также их родители. Риды GBS образцов мягкой и твердой пшеницы выравнивались на референсные сборки IWGSC CS RefSeq v2.1 и Svevo.v1 соответственно. Картирование было проведено с использованием bowtie2 2.5.3 [2]. Для идентификации мутаций использовалась программа freebayes 1.3.7 [3]. Мультиаллельные SNP и инделы были удалены с помощью программы plink2 [4]. В результате после фильтраций у мягкой пшеницы осталось 0,7–1,5 млн SNP, а у твердой пшеницы — 0,9–1,3 млн SNP. Для расчета деревьев в скользящем окне по геному был использован скрипт на R v4.3.1. Для построения дерева использовались только окна, содержащие не менее 10 SNPs. Каждое окно, принадлежность которого одному из родителей у потомков удалось определить однозначно, было окрашено в один цвет (см. рисунок).



Распределение генетического материала родителей в геноме потомков для двух образцов твердой пшеницы (1-2 и 3-4). Каждая вертикальная черта представляет из себя окно генома размером 1 Mbp. Цвет представляет принадлежность к одному из родителей. Белые зоны — области, непокрытые ридами при картировании, или окна, содержащие менее 10 SNPs

Результаты данной работы показали, что данные GBS могут быть использованы для определения принадлежности сегментов хромосом линий-потомков твердой и мягкой пшеницы к одному из линий-родителей. Данный алгоритм визуализации хромосом в дальнейшем может быть использован для поиска интрогрессий в других видах. Также планируется проверка данного метода на сниженном покрытии образцов потомков.

Литература

1. Fontaine M. C. et al. Mosquito genomics. Extensive introgression in a malaria vector species complex revealed by phylogenomics // Science (N. Y.). 2015. Vol. 347, No. 6217. P. 1258524.

2. Langmead B. et al. Scaling read aligners to hundreds of threads on general-purpose processors // Bioinformatics. 2019. Vol. 35, No. 3. P. 421–432.

3. Garrison E., Marth G. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing // arXiv. URL: https://arxiv.org/abs/1207.3907.

4. Chang C. C. et al. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets // Gigascience. 2015. Vol. 4, No. 1. P. s13742-015.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-39

БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК ГЕНОВ СИНТЕЗА БИОСУРФАКТАНТОВ В ШТАММЕ *GORDONIA AMICALIS* G2 *

BIOINFORMATIC SEARCH FOR BIOSURFACTANT SYNTHESIS GENES IN *GORDONIA AMICALIS* G2 STRAIN

А. С. Филиппова[1,2], И. А. Нечаева[1]

[1] Тульский государственный университет
[2] Научно-исследовательский центр «БиоХимТех», Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, Тула

A. S. Filippova[1,2], I. A. Nechaeva[1]

[1] Tula State University
[2] Scientific Research Center "BioChemTech", Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, Tula

✉ stasya.filippova.01@gmail.com

Аннотация

Штамм *Gordonia amicalis* G2 является перспективным объектом для получения микробных гликолипидов с использованием отходов нефтепереработки. Геном штамма *G. amicalis* G2 образован кольцевой хромосомой и кольцевыми плазмидами pCP113 и pCP89. Биоинформатический анализ генома показал наличие ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот и трегалозы, формирующих структуру биосурфактантов.

Abstract

Gordonia amicalis G2 strain is a potential object for the production of microbial glycolipids using oil refinery wastes. The genome of the *G. amicalis* G2 strain consists of a ring chromosome and ring plasmids pCP113 and pCP89. Bioinformatic analysis of the genome showed the availability of enzymes involved in the synthesis of fatty acids and trehalose, which form the structure of biosurfactants.

Представители рода *Gordonia* являются перспективными объектами для применения в биотехнологии, поскольку синтезируют широкий спектр вторичных метаболитов, включающих каротиноиды (эхиненон, адониксантин) [1], алкалоиды (пимпринин, кладониамид С, диолмицины А1 и А2), амиды (мохавенсин А, актиномицин Д), фенилпропаноиды (атрамицин, А и В, куркумин, А, В, С, 1,4-дифенил-2,3-бутандиол), терпеноиды (гордоновая кислота, бендиол А, В, С [2], биосурфактанты (гликолипиды, липопептиды) и экзополисахариды, сидерофоры [3]. Для изучения организации метаболических путей синтеза различных ценных биологически активных соединений активно применяются методы биоинформатического анализа.

Объектом биоинформатического исследования являлся штамм *Gordonia amicalis* G2. Штамм выделен из песка морского порта Кат Лай (г. Хошимин, Вьетнам) и способен продуцировать гликолипидные биосурфактанты при росте на жидких алканах.

Для объекта исследования при помощи методов биоинформатического анализа проведена структурная и функциональная аннотация генома, определены гены, включенные в синтез биосурфактантов.

Геном штамма *G. amicalis* G2 состоит из кольцевой хромосомы и двух кольцевых плазмид pCP113 и pCP89, имеющих высокое содержание GC-пар (более 67 %) (рис. 1).

Проведение функциональной аннотации генома при помощи веб-сервера antiSMASH v.7.0 [4] показало наличие на хромосоме кластеров генов синтеза эктоина, полилизина, каротиноидов (рис. 2) и сидерофора мадурастатина.

Однако не все эти кластеры имеют высокое сходство с референсной последовательностью, хранящейся в базе данных сервера, о чем сообщено в столбце Similarity.

При помощи веб-серверов BlastKOALA [5] и KEGG [6] и алгоритма аннотации бактериальных геномов NCBI PGAP [7] обнаружены гены, имеющие хромосомную локализацию и участвующие в синтезе гликолипидов, состоящих из остатка сахара, этерифицированного остатками жирных кислот (рис. 3).

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-24-20033).

© А. С. Филиппова, И. А. Нечаева, 2024

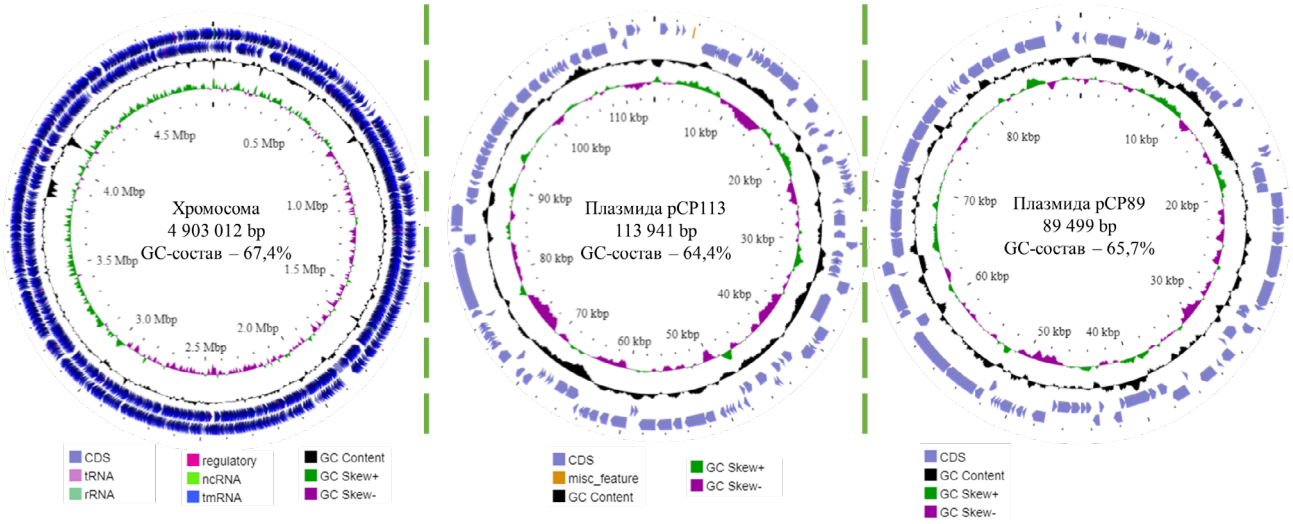
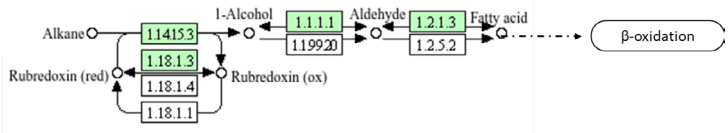


Рис. 1. Структурная организация генома штамма *G. amicalis* G2

Region	Type	From	To	Most similar known cluster		Similarity
Region 1	NRPS, betalactone	162,651	207,600			
Region 2	arylpolyene	424,942	466,105			
Region 3	terpene	630,242	651,394	SF2575	Polyketide:Type II polyketide+Saccharide:Hybrid/tailoring saccharide	6%
Region 4	ectoine	1,014,301	1,024,735	ectoine	Other:Ectoine	75%
Region 5	NRPS	1,815,797	1,909,959	WAP-8294A2	NRP	30%
Region 6	redox-cofactor	1,914,600	1,937,623			
Region 7	NRPS-like, NRPS	2,003,625	2,061,995	atratumycin	NRP	5%
Region 8	NRPS	2,234,403	2,277,456			
Region 9	NAPAA	2,488,303	2,522,181	ε-Poly-L-lysine	NRP	100%
Region 10	terpene	2,609,834	2,630,745	carotenoid	Terpene	33%
Region 11	RiPP-like	2,665,667	2,676,467	streptozotocin	Other	7%
Region 12	T1PKS, NRPS-like	3,101,292	3,173,270			
Region 13	NRP-metallophore, NRPS, NI-siderophore	3,403,621	3,470,065	madurastatin A2/madurastatin E1/madurastatin F/madurastatin G1/madurastatin A1	NRP	17%
Region 14	NRPS	3,945,957	3,999,960			

Рис. 2. Функциональная аннотация последовательности хромосомы штамма G. amicalis G2, выполненная с использованием веб-сервера antiSMASH v. 7.0 [4]

а



б

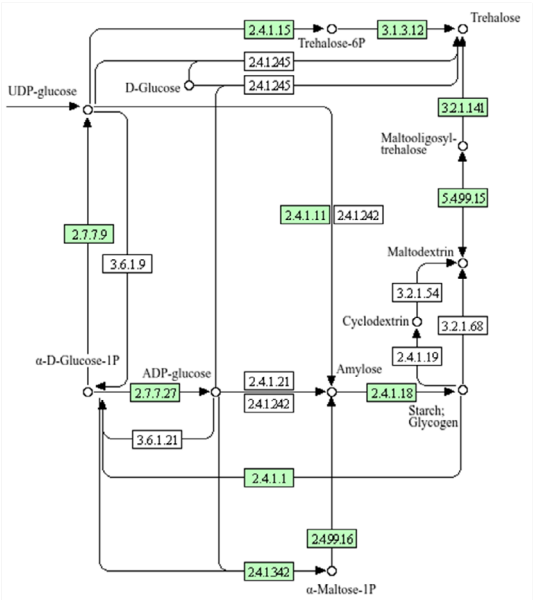


Рис. 3. Реакции превращения алканов в жирные кислоты (*а*) и пути синтеза трегалозы (*б*), найденные в геноме штамма *G. amicalis* G2 при помощи серверов BlastKOALA [5] и KEGG [6]

Путь трансформации алканов включает в себя последовательное окисление алкана под действием рубредоксинзависимой алкан-1-монооксигеназы (КФ 1.14.15.3), алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) и альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3). Образовавшиеся в результате деградации кислоты включаются в путь β-окисления для синтеза жирных кислот с необходимой длиной углеводородной цепи (см. рис. 3, *а*). Для синтеза трегалозы в качестве исходного соединения могут выступать УДФ-глюкоза и глюкозо-1-фосфат, мальтоза-1-фосфат и мальтодекстрины, которые синтезируются в клетке в процессе ее жизнедеятельности (см. рис. 3, *б*).

Таким образом, в результате проведенного анализа, установлено, что штамм *G. amicalis* G2 может стать перспективным объектом для получения микробных поверхностно-активных веществ с использованием отходов нефтепереработки, содержащих жидкие углеводороды.

Литература

1. Loh W. L. C. et al. Exploring the fermentation characteristics of a newly isolated marine bacteria strain, Gordonia terrae TWRH01 for carotenoids production // J. Biosci. Bioengin. 2020. Vol. 130, No. 2. P. 187–194.

2. Sánchez-Suárez J. et al. Specialized Metabolism of Gordonia Genus: An Integrated Survey on Chemodiversity Combined with a Comparative Genomics-Based Analysis // BioTech. 2022. Vol. 11, No. 4. P. 53.

3. Lienkamp A. C., Haarmann M., Tischler D. Gordonia: versatile actinobacteria for biotechnology // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2021. Vol. 689, No. 1. P. 012024.

4. Веб-сервер antiSMASH v.7.0. URL: https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start.

5. Веб-сервер BlastKOALA. URL: https://www.kegg.jp/blastkoala/.

6. Веб-сервер KEGG. URL: https://www.genome.jp/kegg/.

7. Алгоритм аннотации бактериальных геномов NCBI PGAP. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-40

РАНЖИРОВАНИЕ И ОТБОР КАССЕТНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ГЕННОЙ СЕТИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОРНОГО РАССТРОЙСТВА

RANKING AND SELECTION OF CASSETTE REGULATORS FOR POSTTRAUMATIC STRESS DISORDER GENE NETWORK RECONSTRUCTION

Д.-М. В. Цейликман, Е. В. Бурлаков

Челябинский государственный университет

D.-M. V. Tseilikman, E. V. Burlakov

Chelyabinsk State University

✉ efimed4@gmail.com

Аннотация

Посттравматическое стрессорное расстройство (ПТСР) — тяжелое психическое состояние, возникающее как ответ на травмирующее событие. Исследования показывают, что подверженность ПТСР зависит от генотипа особи. Генные сети являются хорошим инструментом для моделирования патологии с целью поиска мишеней для лекарственных средств, а микроРНК — кассетные регуляторы генных сетей. В данной работе мы совершили отбор микроРНК, ассоциированных с ПТСР.

Abstract

Post-traumatic Stress Disorder (PTSD) is a severe mental health condition that occurs in response to a traumatic event. Studies show that susceptibility to PTSD depends on the genotype of the individual. Gene networks offer a good tool for modeling pathology to find drug targets, and microRNAs are cassette regulators of gene networks. In this study, we have selected and ranked miRNAs associated with PTSD.

ПТСР («афганский синдром») в том или ином виде известно науке с античности и, как правило, было ассоциировано с патологическими изменениями, следующими за травмирующим событием. В действительности психологическая травма приводит к развитию ПТСР в 25–35 % случаев [1], особей принято делить на восприимчивых и невосприимчивых к ПТСР. Последние исследования показывают, что восприимчивость к ПТСР часто коррелирует с экспрессией определенных генов, таких как BDNF, NR3C1 и т. д. Действующий список молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с ПТСР, можно посмотреть на интернет-портале PTSD Database [2]. Для моделирования патологии удобно использовать генные сети — группы координированно работающих генов. Подобные сети хорошо подходят для дальнейшей разработки терапии по таргетным мишеням-белкам.

Особый интерес представляют регуляторные единицы в генных сетях, такие как метилирование и микроРНК / малые интерферирующие РНК. МикроРНК также называют кассетными регуляторами генных сетей — микроРНК комплементарны определенному фрагменту одной или нескольких мРНК, за счет этого они регулируют экспрессию определенных генов, следовательно — протеом и метаболом, что напрямую влияет на фенотипические проявления патологии. В настоящее время не так много статей посвящено микроРНК как диагностическим или прогностическим маркерам в целом, поэтому для последующей реконструкции генной сети ПТСР нами были отобраны и ранжированы все микроРНК, комплементарные достоверным молекулярно-генетическим маркерам ПТСР с Integration Score (IS) ⩾ 0,6.

Данные по микроРНК были собраны из базы данных Университета Торонто, mirDIP [3], далее было произведено ранжирование всех комплементарным искомым генам в соответствии с суммированием IS. Для определения четкой роли молекулы в сети (подавление или развитие сенситизации особи к травмирующему фактору) мы поделили исследуемые микроРНК на три группы в соответствии с IS по отношению к генам, экспрессия которых ассоциирована с сенситизацией и восприимчивостью к ПТСР — подавление, развитие или смешанный паттерн.

В первую группу вошли микроРНК, связанные с экспрессией NR3C1, ADCYAP1R1, TXNRD1, — hsa-miR-204-5p, hsa-miR-211-5p, hsa-miR-328-3p. Во вторую группу вошли микроРНК hsa-miR-18b-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-548c-3p. В третью группу вошли микроРНК, связанные с экспрессией BDNF, DICER1, FKBP4/5, — hsa-miR-206, hsa-miR-424-5p, hsa-miR-1-3p.

© Д.-М. В. Цейликман, Е. В. Бурлаков, 2024

Стоит отметить, что данные, полученные биоинформатическим путем, в дальнейшем следует проверить в ходе эксперимента.

Литература

1. Brillon P. Comment aider les victimes souffrant de stress post-traumatique. Montréal (Québec): Les Éditions Québec-Livres, 2013. 456 p.

2. PTSD Database. URL: https://ptsd.scai.fraunhofer.de.

3. mirDIP. URL: https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/.

РАЗДЕЛ II

БИОТЕХНОЛОГИИ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-41

ULTRASENSITIVE-SELECTIVE DNA MACHINE FOR TESTICULAR GERM CELL TUMORS DETECTION *

M. Alaji[1], A. Shalaev[2], D. M. Kolpashchikov[3–5], A. A. Eldeeb[1]

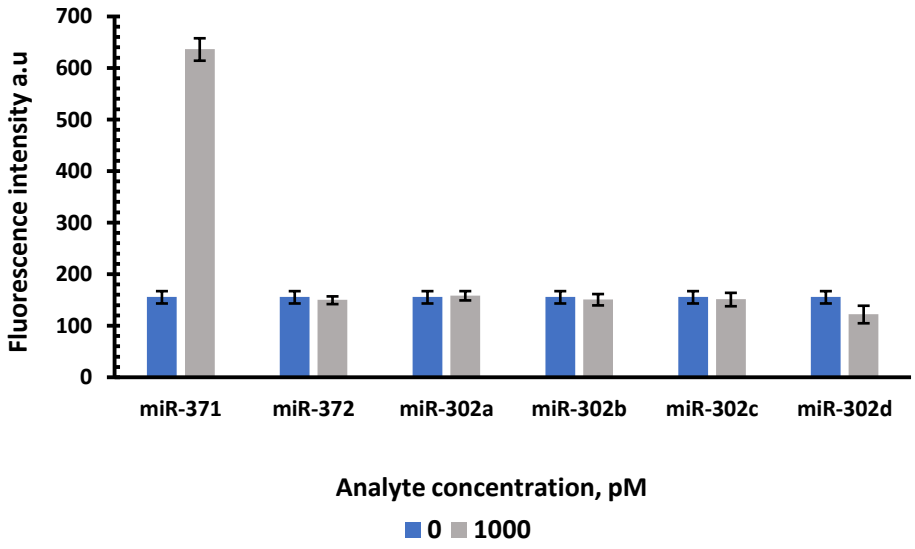
[1] *SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *Subcellular Technology Lab., N. N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Saint Petersburg*
[3] *Chemistry Department, University of Central Florida, Orlando, USA*
[4] *Burnett School of Biomedical Sciences, University of Central Florida, Orlando, USA*
[5] *National Centre for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA*

✉ alaji@scamt-itmo.ru

Abstract

Although advancements in cancer biomarkers detection have improved, current techniques for detecting Testicular Germ Cell Tumors (TGCTs) struggle with specificity. This study introduces a novel DNA machine (DNM) that ensures high selectivity in detecting miR371, a critical biomarker for TGCTs, overcoming the challenges posed by the presence of similar miRNAs.

TGCTs are the leading solid malignancy in young men, originating from germ cells in the testicles. Early and precise detection is crucial for effective treatment and better patient outcomes. miR371, a microRNA elevated in the early stages of TGCT, can be considered as a TGCT related oncomarker [1], but its high sequence similarity with five other miRNAs (miR372, miR203a, miR302b, miR302c, miR302d) complicates detection using conventional PCR methods, reducing diagnostic specificity.



Testing the DNM design to detect miR371 compared to five other similar miRNAs

* The research was supported by the Priority 2030 Federal Academic Leadership Program
© M. Alaji, A. Shalaev, D. M. Kolpashchikov, A. A. Eldeeb, 2024

DNA machines based on binary deoxyribozyme (Dz) offer a cost-effective, sequence-specific, and sensitive alternative for DNA/RNA analysis. The catalytic core formation of binary Dz is pivotal for accurate analyte recognition. A binary Dz consists of two separate strands that hybridize to the target miRNA, forming a catalytic core. This core subsequently binds and cleaves a fluorogenic reporter substrate, amplifying the detection signal [2]. Recent developments, including the hook-equipped DNA machine (HDNM), have enhanced detection sensitivity [3].

Our DNM design incorporates miR371-binding arms complementary to miR371 but with deliberate mismatches for the five similar miRNAs. These mismatches increase free energy and cause unstable hybridization, preventing stable Dz catalytic core formation with non-target miRNAs. This instability ensures high selectivity, specifically targeting miR371. Initial experiments with synthetic miRNAs confirmed the DNM's superior selectivity and sensitivity (see Figure), achieving a limit of detection of 28.9 pM. Further tests with clinical samples from TGCT patients and healthy donors demonstrated a 68.2 % accuracy rate in identifying TGCT subtypes from 22 samples.

The innovative design of our DNM enhances selectivity, addressing key issues with current methods. Although PCR is still needed for sensitivity, DNM's high selectivity for miR371 reduces false positives, improving diagnostic accuracy. This makes DNM a valuable tool for early and precise TGCT diagnosis.

References

1. Nestler T., Schoch J., Belge G., Dieckmann K. MicroRNA-371a-3p — The Novel Serum Biomarker in Testicular Germ Cell Tumors // Cancers. 2022. Vol. 15 (15). P. 3944.

2. Kolpashchikov D. M. A binary deoxyribozyme for nucleic acid analysis // Chembiochem: A Eur. J. Chem. Biol. 2007. Vol. 8, 17. P. 2039–2042.

3. Hussein Z., Nour M. A. Y., Kozlova A. V. et al. DNAzyme Nanomachine with Fluorogenic Substrate Delivery Function: Advancing Sensitivity in Nucleic Acid Detection // Anal. Chem. 2023 Vol. 95 (51). P. 18667–18672.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-42

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW MILK FROM THE SOUTH OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA*

M-M.A. Barbaros[1], A.A. Cartasev[1,2], I.S. Neicovcena[2], N.Y. Mahamat[2]

[1] *Scientific and Practical Institute of Horticulture and Food Technology, Chisinau, Republic of Moldova*
[2] *Comrat State Universrity, Republic of Moldova*

✉ barbarosmarcela@gmail.com

Abstract

Lactic acid bacteria are crucial in the functional food industry, producing metabolites like exopolysaccharides and bacteriocins. These enhance food's nutraceutical properties, offering health benefits such as protection against oxidative stress, and improved cardiovascular function. Traditionally raw milk is a rich source of microorganisms. This paper presents findings on lactic acid bacteria from Moldovan raw milk and their biotechnological potencial.

Various metabolites, which contribute positively to the nutritional, sensory, and technological aspects of dairy products, are generated by different strains of lactic acid bacteria (LAB) due to their genetic diversity within the species. Consequently, comprehensive molecular and functional characterization of the microbiota in dairy products at the strain level is essential for enhancing autochthonous milk products, creating new starter cultures, and formulating functional foods.

The dairy industry needs indigenous starter cultures to ensure a controlled fermentation and a superior quality of dairy products. The adaptation of LAB to local milk is crucial for obtaining an optimal fermentation and superior quality dairy products, thus supporting the need for the development of autochthonous starter cultures in the Republic of Moldova.

Raw milk and fermented foods are traditionally rich sources of microorganisms with potential benefits for the food industry and health. This brief review presents our key findings on the diversity of LAB in raw milk from southern Moldova, as well as the isolation and characterization of metabolites produced by these bacteria, which could be used in food biotechnology [1].

In the study, 150 raw milk samples were collected from the southern region of the Republic of Moldova. The results showed that Moldovan raw milk mainly contains mesophilic LAB, with lactococci and streptococci being the predominant types, as noted in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Some samples also had lactobacilli. The presence of thermophilic LAB is typical in the southern regions of Moldova.

During the examination of cultural properties, we determined the following: colony diameter, shape (circular, punctiform, filamentous, irregular, lenticular, etc.), edge characteristics (smooth, wavy, filamentous, lobate, etc.), surface (flat, convex, raised, pointed, etc.), color (white, yellow, cream), structure (homogeneous, heterogeneous, granular, etc.), and consistency (viscous, greasy, dry, etc.).

In this study, we focused on selecting thermophilic lactic acid bacteria to develop starter cultures for yogurt production. We identified and selected 5 strains of *Streptococcus thermophilus* L 06, L 19, L 22, L 35, L 38 and 2 strains of *Lactobacillus bulgaricus* L 42, L 45.

The selected strains, when cultured in a milk hydrolysate agar medium, form colonies with the following characteristics: on the surface, they are round, drop-shaped with smooth edges (type S); in depth, they appear lenticular and have a white-cream color; in terms of size, they are small (up to 1 mm) with a pasty and greasy consistency.

The initial assessment of bacterial cell morphology is crucial for final identification. For *S. thermophilus*, the following morphological parameters were studied: cell shape and arrangement, mobility, size, and Gram staining characteristics. The morphological study of lactic acid bacteria strains relies on microscopic examination of stained and fixed preparations.

The testing of bacteria for EPS production was conducted using protein separation from the culture medium with trichloroacetic acid and polysaccharide precipitation with ethanol. The research identified 4 EPS-producing strains — three of S. thermophilus and one of L. bulgaricus.

Thus, of the 4 native thermophilic lactic acid bacteria strains with high and stable EPS production activity, which meet the technical requirements for yogurt coagulation, some can serve as alternatives to stabilizers used in the dairy industry. The research demonstrates the potential to select native lactic acid bacteria strains with natural technological potential (non-genetically modified) and use them in producing safe dairy products.

* This work was supported by a grant ANCD 23.70105.5107.05T LACTANOX.

© M-M.A. Barbaros, A.A. Cartasev, I.S. Neicovcena, N.Y. Mahamat, 2024

To assess the antibacterial activity of selected *S. thermophilus* strains, *S. aureus* ATCC® 25923™ and *E. coli* ATCC® 25922™ were used as test cultures. The antagonistic activity of these thermophilic streptococci was evaluated using the agar diffusion method. The results demonstrate significant antagonistic effects against pathogenic microorganisms, with inhibition zones ranging from 16 to 18 mm for *E. coli* and 19 to 21 mm for *S. aureus*. This suggests that the selected strains are effective in inhibiting the growth of intestinal infections.

Our research demonstrates that natural environments, such as traditional fermented foods, are highly diverse and serve as valuable sources of new strains and species within the LAB group. These strains possess functional properties, such as bacteriocin or EPS production, and exhibit prebiotic or probiotic effects, making them promising candidates for biotechnological applications.

References

1. Cartasev A. Identification, characterization and industrial utilization of autochthonous strains of Streptococcus thermophilus isolated from Moldavian raw milk and dairy products of spontaneous fermentation // Ukrainian Food J. 2018. Vol. 7, is. 3. P. 453–463.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-43

A CASE STUDY OF PREVENTING IGG4 DRUG PRODUCT AGGREGATION

E. G. Li, O. A. Karpunina, A. N. Morozov, O. L. Evdokimova

Generium, JSC, Volginsky

✉ egli@generium.ru

Abstract

Protein aggregation is one of the major challenges in developing and manufacturing drug products based on monoclonal antibodies. The focus of the present work is the investigation of protein aggregation mechanisms that may occur during its manufacturing. The comprehensive approach to study of the target molecule stability was applied to all production stages.

Unique capability of therapeutic proteins to specifically bind with a particular target *in vivo* makes them ideal candidates for the next generation drugs development. However, protein aggregation can reduce the effectiveness and safety of target molecules, while increasing the drug immunogenicity. Protein aggregation is one of the major challenges in developing and manufacturing drug products (DP) based on monoclonal antibodies [1]. The mechanisms of protein molecules aggregation can be divided into five main types: aggregation of native protein, aggregation of chemically modified product, aggregation of conformationally-altered monomer, nucleation-controlled aggregation and surface-induced aggregation [1, 2]. It is worth noting that these mechanisms are not mutually exclusive, and for the same product aggregation can occur in different ways.

There is a wrong assumption that the drug product stability depends only on the finished formulation development stage, namely the correct choice of buffering agents, pH value as well as added excipients. At the same time, destabilization of the target protein can be triggered at different steps of the production and, therefore, affect the drug product stability during its long-term storage [3]. Establishing the degradation profile of the target molecule is one of the most important approaches to identify possible problems with the active substance stability throughout its life cycle even in the early development stages.

The main purpose of this investigation was to examine mechanisms of protein aggregation that may occur during manufacturing process of the drug product. For this, the degradation profile of the target molecule IgG4 produced by JSC "GENERIUM" was established using different forced degradation tests, such as high temperature, mechanical stress, light exposure, extreme pH range, oxidation and freeze/thaw cycles. The critical quality attributes of the target protein after stress tests were investigated using different methods where the most relevant were exclusion chromatography (aggregates and fragments), ion exchange HPLC (acidic and basic forms), capillary electrophoresis in reducing and non-reducing, denaturing conditions (related substances). Conformational and colloidal stability of the DP was characterized by establishing T_m and T_{agg} using differential scanning fluorimetry (DSF) and static light scattering (SLS) methods. The average hydrodynamic radius of the target molecule was analyzed using dynamic light scattering (DLS).

The most revealing experiments for the DP based on IgG4 were such stress tests as continuous shaking, high temperature and low pH. In particular, the purity (size exclusion HPLC) of the DP was found to be decreased to 30 % after shaking. The average size of the DP after this stress testing was shifted up to 3–4 nm compared to the control sample and indicated the aggregation process. To solve this problem possible aggregation mechanisms were investigated. It was found that the aggregation of the target protein could be related to the oxidation caused by its treatment with low pH (3.0–3.5) during chromatographic purification. After excluding this stage from the downstream process the DP stability was significantly increased.

The obtained results revealed that the comprehensive approach to the study of the target molecule stability should be applied at all production stages.

References

1. Wang W., Roberts C. J. Protein aggregation — Mechanisms, detection, and control // Int. J. Pharm. 2018. Vol. 550 (1–2). P. 251–268.

2. Philo J. S., Arakawa T. Mechanisms of protein aggregation // Curr. Pharm. Biotechnol. 2009. Vol. 10 (4). P. 348–351.

3. Vázquez-Rey M., Lang D. A. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes // Biotechnol. Bioeng. 2011. Vol. 108 (7). P. 1494–1508.

© E. G. Li, O. A. Karpunina, A. N. Morozov, O. L. Evdokimova, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-44

DOWNSTREAM PROCESS FOR MODIFIED BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION WITH AN INCREASED FUNCTIONAL PROPERTIES FOR TEXTILE INDUSTRY*

E.I. Mikheeva, M.A. Kuranova, A.A. Gorokhova

ITMO University, Saint Petersburg
byScoby, LLC, Saint Petersburg

✉ mikheeva_ekaterina@scamt-itmo.ru

Abstract

Bacterial cellulose as a promising biomaterial might be used in various industries. Due to the presence of biodegradability and biocompatibility properties, bacterial cellulose can serve as an alternative to animal-derived textiles. The paper considers biotechnological approaches to the downstream process of bacterial cellulose production with functional properties similar to leather products.

The growing needs in the market of textile goods require new approaches to the creation of not only manufacturing technologies, but also the strategies of seeking novel materials as alternatives to traditional ones. The promising biomaterials, such as bacterial cellulose and its derivatives in the form of biopolymers, appear in the latest research and technological trends. Due to the ecological aspects of the possibility of leather replacement the novel approaches to bacterial cellulose produced are needed to be considered [1].

The bioprocess of bacterial cellulose production was based on microbiological synthesis of biomaterial, such as the upstream process of stationary surface cultivation of *Komagataeibacter xylinus* (byScoby LLC, Saint Petersburg), in batch mode during 10 days. In this case, the classical approaches for upstream production were not modified. The obtained biomass was applied for several series groups in the design of the experiments plan. The following development belongs to the ex-situ approach of production optimization implying the post-cultivation processing of the bacterial cellulose, including the subsequent steps of material mercerization, washing, plastification, hydrophobization and drying. In the frame of design factors, there were parameters for variation, such as concentration of plastifying agent (glycerol) from 2.0 % to 10.0 % and hydrophobic agent (saturated fatty acid) from 1.0 to 4.0 %. The achieved properties corresponded to the organoleptic profile of leather materials and were subjected to subsequent testing. The final yield of bacterial cellulose production in accordance with the suggested downstream process amounted to the (3,8 ± 0,5) g/L (by air-dry weight) [2, 3].

The processed materials were tested with genuine and artificial leather for several criteria, such as tensile strength, tear resistance, thermostability and water adsorption. The final results demonstrated the relative resemblance of modified bacterial cellulose to leather materials. The value of tear resistance of the final product exceeded the leather materials that proved to be a sufficient alternative of modified bacterial cellulose over the analogues.

As a result, comparatively similar physico-chemical and rheological properties were achieved. This biotechnological approach of downstream production might be further scaled up to the industrial level of manufacturing (more than 50 L cultivation). Moreover, the implementation of in-situ modification technology to this process would enhance the total production yield highlighting the considerable potential to technological transfer.

References

1. Gregory D.A., Tripathi L., Fricker A.T. et al. Bacterial cellulose: A smart biomaterial with diverse applications // Mater. Sci. Eng.: R: Reports. 2021. Vol. 145.

2. 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.

3. Gilmour K.A., Aljannat M., Markwell C. et al. Biofilm inspired fabrication of functional bacterial cellulose through ex-situ and in-situ approaches // Carbohydr. Polym. 2023. Vol. 304.

* The research was funded by Foundation for Assistance to Small Innovative Enterprises (grant № 1379ГССС15-L87988 from 01.09.2023).

© E.I. Mikheeva, M.A. Kuranova, A.A. Gorokhova, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-45

BIOTESTING OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS FROM QUAIL LITTER

K. S. Romanovskaya

Institute of Environmental Engineering, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

✉ romanovskaya-ks@rudn.ru

Abstract

The study investigated the effect of volatile organic compounds (VOCs) emitted by quail litter on various test organisms. Odors from litter are a significant problem, and their content, changes in VOC composition in dynamics and impact on biota are not well-studied. In biotesting, parameters such as cell viability and physiological characteristics were evaluated. Biotesting conducted on typical test objects revealed the hazard of VOCs to biota. The results are discussed in the context of VOC composition and public health safety.

Poultry farming is accompanied by waste, including litter, which is hazardous to the environment when accumulated. There are various approaches to the storage and disposal of such waste, the primary objective of which is to make the waste safe. Most often poultry waste is fermented, composted, and microbiological preparations are used to decompose the waste. A particular problem is the strong specific odor of poultry litter. Often litter is stored and volatile organic compounds (VOCs) affect the environment for a long time. The aim of this study was to conduct biotesting of VOCs from quail litter.

The unicellular green alga *Chlorella vulgaris* M. Beijerinck, isolated from communities developing on the surface of rocks and clay sediments in the fotic zone of the Waz-Abaa cave, was selected as a test object. The object was chosen because the alga is often used for biotesting, and the entrance zones of caves located in places where anthropogenic impact is minimal are among the reference habitats. *Chlorella vulgaris* was isolated from natural communities, cultured in Bristol medium (Hollerbach's modification) at 24 °C, under 30–40 μmol·m^{-2}·s^{-1} illumination. A 1 ml suspension of algae was applied to the surface of Bristol agarose medium in a Petri dish and evenly distributed on the surface; after 24 hours the dish was placed into the box with litter. The initial concentration of *Chlorella vulgaris* was 10^6 cells/mL, the exposure time was 7 days, and the result was evaluated on days 7, 14, and 21. The experiment was conducted under natural light. The change in cell number was determined in comparison with the control. Control measurements were conducted in the same way without VOCs. To analyze the number of cells, the number of cells was calculated with a light microscope on 1 cm^2 of the medium surface at 5 points on the diameter of Petri dish. Lyophilized luminescent bacteria («Ecolum» test system) was also used for biotesting. The test system was poured onto a Petri dish with agarose substrate and put into the box with litter for one hour.

The result revealed a decrease in cell numbers of 70 ± 3 % on day 7, 80 ± 2 % on day 14 and 90 ± 1 % on day 21. The toxicity index of litter was 48–62 on day 7, 51–64 on day 14 and 46–56 on day 21, these are the toxicity and strong toxicity indices of the sample.

It was previously determined by mass spectrometry that the VOCs of poultry litter predominantly contain sulfur compounds (sulfur (IV) oxide, dimethyl sulfide, mercaptan, disulfide) as well as alkenes (butene, isoprene, isoctene), isopropanol, limonene, ethyl acetate, trimethylamine, indole, diethyl ether, tetrahydrofuran, and dioxane derivatives. It is obvious that these compounds, accumulating in the volume of the box, create a toxic effect and lead to the death of soil algae [1, 2]. Thus, it can be concluded that VOCs of litter not only cause unpleasant odor, but also are hazardous for the population living near the places where quail litter waste is stored.

References

1. Kharlamova M., Adamovich M., Romanovskaya K. et al. Decomposition of individual components of bio-organic waste: volatile organic compounds and the impact on health and psycho-emotional state // RUDN J. Ecol. Life Saf. 2023. Vol. 31 (3). P. 391–406.

2. Kharlamova M., Romanovskaya K., Borisova A., Vyshelessky A. Characteristics and Composition of Volatile Organic Compound (VOC) Emissions from the Decomposition of Selected Bioorganic Wastes Fractions // Chem. Saf. Sci. 2024. Vol. 8 (1). P. 122–142.

© K. S. Romanovskaya, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-46

INFLUENCE OF THE DNA BINDING PROTEIN SSO7D FROM *S. SOLFATARICUS* ON THE ACTIVITY OF BOVINE DNA-EXOTRANSFERASE AND ITS TRUNCATED VARIANTS *

A. B. Sachanka, S. S. Dolgaya, V. V. Shchur, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich

Institute of Bioorganic Chemistry of NAS of Belarus, Minsk

✉ antosuk@yandex.ru

Abstract

The Sso7d protein is widely used to develop fusion DNA polymerases with enhanced properties. In this study, we investigate the impact of the presence Sso7d in the reaction mix on the activity of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) and its truncated variants. The aim of this work to assess the expediency of developing an improved fusion enzyme by leveraging Sso7d and TdT proteins.

Motivation and Aim

Although TdT was discovered in the 1960s, it is currently under specific focus of modern biology. TdT is a distinctive enzyme that can add nucleotides at the 3'-terminus of single-stranded DNA without the need for a template [1]. TdT is currently considered as the only way to realization of enzymatic *de novo* synthesis of DNA [2]. DNA-binding protein from *S. solfataricus* (Sso7d) has been successfully used before to developing improved tools for molecular biology through the genetic fusion of the genes encoding Sso7d and various enzymes such as DNA polymerases [3]. Sso7d has nonspecific binding activity to any dsDNA and RNA sequences and distort the structures of duplex DNA, which contributes to its stabilization and may negatively affect the activity of TdT. We anticipate gaining valuable insights into the impact of the presence Sso7d in the reaction mix on the activity of TdT and its truncated variants, which we can use for the development of new, improved fusion enzymes to realize enzymatic *de novo* synthesis of DNA.

Methods

The TdT and Sso7d genes optimized for *E. coli* expression were synthesized by chemical-enzymatic synthesis, amplified and subcloned into the pCWori vector (NdeI-HindIII sites). Truncated TdT at 110 and 148 N-terminus amino acids (110_TrTdT and 148_TrTdT) was obtained by PCR amplification of native TdT and ligated into the same vector. For protein expression we used *E. coli* strain BL21 (DE3) which cultivated in TB media at high aeration and 37 °C to A_{600} equal to 0.6 and protein synthesis was started by IPTG induction (1 mM) at 18 °C. After 24 h cultivation cells were separated from medium by centrifugation. The proteins were purified to homogeneity by immobilized metal affinity chromatography. The enzymatic activity of proteins was determined by the amount of reaction products (detected at a wavelength of 260 nm) fractionated on a C18 column (2.1 × 50 mm, 1.9 μm) by standard methods of ion-pair reverse-phase chromatography.

Results

A study reaction without Sso7d with substrates T_5, T_{15} T_{35} showed that the activity of the TdT, 110_TrTdT and 148_TrTdT increased with increasing oligonucleotide length. For the reaction with T_{15} ions of Co^{2+} has an activating effect, while Zn^{2+} cations reduce TdT and truncated variants activity. The presence of Sso7d in the reaction mix leads to a slight (up to 15 %) decrease in native TdT and 110_TrTdT activity for substrates T_5 and T_{15} and a more pronounced decrease for T_{35} (up to 30 %). Ions of Co^{2+} and Mn^{2+} were initially used as a replacement for Mg^{2+} in TdT reaction buffer to destabilize DNA duplexes, especially in the blunt-end extension reaction. It can therefore be assumed that the influence of Co^{2+} cations in the reaction mixture could be the reason for the less pronounced inhibitory effect of the Sso7d protein. In the absence of Me^{2+}, the inhibitory effect of Sso7d increases with oligonucleotide chain length, indicating that the mechanism of inhibition is not related to protein-protein interactions of Sso7d and TdT, but rather is mediated by the competitive interaction of Sso7d with DNA. It is curious that for 148_TrTdT, the presence of Sso7d in the standard reaction mixture, on the contrary, contributed to an increase in the amount of reaction products by 40 %.

* This research was financially supported by the National Academy of Sciences of Belarus (project grant agreement no. 2023-27-021 and BRFFI grant № X21M-056).

© A. B. Sachanka, S. S. Dolgaya, V. V. Shchur, S. A. Usanov, A. V. Yantsevich, 2024

Conclusion

In all cases, the presence of Sso7d in the reaction mix leads to a reduction in TdT and 110_TrTdT activity. Only for 148_TrTdT we observed a positive effect from Sso7d, which can be used to construction of a fusion enzyme or to increase the amount of DNA obtained during synthesis.

References

1. Fowler J. D., Suo Z. Biochemical, structural, and physiological characterization of terminal deoxynucleotidyl transferase // Chem. Rev. 2006. Vol. 106 (6). P. 2092–2110.

2. Motea E. A., Berdis A. J. Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a misguided DNA polymerase // Biochim. Biophys. Acta — Proteins Proteomics. 2010. Vol. 1804 (5). P. 1151–1166.

3. Wang Y. et al. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32. P. 1197–1207.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-47

BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS THE ANTIVIRAL DRUG RIBAVIRIN ANALOGUES MODIFIED ON THE AMIDE GROUP

O. S. Smirnova, I. D. Konstantinova

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ gescheites@gmail.com

Abstract

Ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is a well-known antiviral nucleoside. It has attracted interest for more than 40 years due to its unique spectrum of activity and still unclear mechanism of action. However, ribavirin has a high systemic toxicity and teratogenicity. Therefore, the search for new analogs of ribavirin with lower toxicity and high antiviral activity is still relevant.

Ribavirin analogs substituted at the C3 position of the heterocyclic in the carboxamide group were synthesized by the transglycosylation reaction with E. coli PNP.

The antiviral activity of nucleosides has been tested against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and influenza virus H5N1.

Ribavirin (1-β-Dribofuranosyl1,2,4-triazole-33-carboxamid, Virasole) is a modified nucleoside effective against a wide spectrum of DNA and RNA viruses. It demonstrates pronounced efficiency in treatment of hepatitis C and Lassa fever, as well as influenza of A and B types. Ribavirin, however, has serious side effects in the blood forming organs of patients: it causes hemolytic anemia. This fact motivates researchers to search for safer therapeutic drugs with less systemic toxicity. The chemo enzymatic (biotechnological) approach to the synthesis of ribavirin and its new analogues displaces the classic multistage chemical processes and allows carrying out the key reaction (transglycosylation) with high efficiency, region- and stereo-selectivity. Moreover, testing novel derivatives of 1,2,4-trizole as substrates of *E. coli* purine nucleoside phosphorylase (PNP) can reveal structural features of heterocyclic bases defining the potential for performing the reaction of the synthesis of modified nucleosides on their bases in the active site of the enzyme. This widens our view of the mechanism of the function and synthetic abilities of the enzyme.

N-cyclic aliphatic and aromatic 1,2,4-trizole carboxamides were found to be good substrates with the extent of conversion to the respective nucleosides up to 99 %. Ten ribavirin analogues were prepared after optimization of the conditions of enzymatic reactions (the most effective ribose donor was identified, the nucleoside/base ratio and the optimal amount of enzyme were determinate). A ribo- and 2-desoxyribo-nucleosides of N-substituted 1,2,4-triazole carboxamides were synthesized with a 30–90 % yield.

Unfortunately, this approach to the synthesis of nucleosides cannot be used in the synthesis of arabino- and 2-fluoroarabino- nucleosides of 1,2,4-trizole.

Investigation of antiviral activity of the synthesized compounds in the models of hepatitis C, herpes simplex virus type 2, type A and b flu viruses is currently being conducted in the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology Named After the Honorary Academician N. F. Gamaleya.

© O. S. Smirnova, I. D. Konstantinova, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-48

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ПРОТЕАЗЫ ULP1 И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ГИДРОЛИЗА SUMO-ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OBTAINING THE ACTIVE FORM OF ULP1 PROTEASE AND SELECTION OF OPTIMAL CONDITIONS FOR HYDROLYSIS OF SUMO-HYBRID PROTEINS

П. С. Астрелина, А. В. Казакова

R&D ГЕРОФАРМ, Санкт-Петербург

P. S. Astrelina, A. V. Kazakova

R&D GEROPHARM, Saint Petersburg

✉ Polina.Astrelina@gerophar m.com

Аннотация

В работе представлен метод получения активной формы протеазы Ulp1 в виде свежеприготовленного солюбилизата телец включения. Проведен подбор условий гидролиза SUMO-гибридного белка, определена минимальная концентрация фермента, обеспечивающая полную конверсию гибридного белка.

Abstract

The paper presents a method for obtaining the active form of Ulp1 protease in the form of freshly prepared solubilized inclusion bodies. The conditions of hydrolysis of the SUMO hybrid protein were selected, the minimum concentration of the enzyme was determined, which ensures complete conversion of the hybrid protein.

Белки SUMO (*small ubiquitin-like modifier proteins*) представляют собой семейство небольших молекул, которые ковалентно присоединяются к другим белкам в клетке или отделяются от них для изменения функции модифицируемых субстратов. В биотехнологии SUMO могут использоваться в качестве метки для рекомбинантных белков. В настоящий момент технология получения SUMO-гибридных белков является распространенным инструментом для повышения функциональной экспрессии белка у про- и эукариот, а также для улучшения его растворимости. Как правило, в качестве N-концевой метки используется *Saccharomyces cerevisiae* Smt3 (дрожжевой SUMO). Метка эффективно удаляется SUMO протеазой 1 (Ulp1), распознающей трехмерную структуру SUMO, а также С-концевую последовательность. В результате расщепления образуется целевой белок с нативным N-концом. Распространенным решением является добавление полигистидиновой метки (His 6 tag) к протеазе для облегчения дальнейшей очистки образца от фермента.

Получение и очистка рекомбинантной протеазы Ulp1 в лабораторных условиях достаточно затруднены и требуют тщательного подхода к разработке. В качестве варианта производства применяется экспрессия каталитического домена Ulp1 в клетках *E. coli* в растворимой форме с дальнейшей экстракцией. Однако исследования показывают, что растворимый Ulp1 может быть токсичен для клеток-продуцентов [1], что снижает конечный выход фермента. Ulp1 также может быть получен в виде телец включения с сохранением высоких показателей выхода; но для его преобразования в активную форму необходимы дополнительные длительные стадии очистки, которые снижают его каталитическую активность. Использование готовой коммерческой формы фермента также сопряжено с рядом трудностей. Среди недостатков исследователи отмечают высокую стоимость, труднодоступность товара, сложности хранения и транспортировки [2].

В работе рассмотрен быстрый и эффективный метод получения активной формы Ulp1 из телец включения. Для удаления остатков питательной среды и клеточного дебриса была проведена отмывка материала в буфере состава 5 мМ EDTA, 20 мМ Tris, 2 М Urea, 0,5 % Sodium deoxycholate в соотношении 10 мл буфера на 1 г телец. Далее проводили солюбилизацию телец включения для перевода фермента в растворимую форму. Для оценки активности протеазы при проведении гидролиза свежеприготовленный солюбилизат в разных концентрациях добавляли к субстрату гибридного SUMO-белка, смесь выдерживали в течение одного часа при комнатной температуре. Эффективность гидролиза оценивали методом SDS-PAGE.

В ходе экспериментов было обнаружено, что наиболее полная конверсия гибридного белка наблюдается при использовании 0,08–0,16 г телец включения протеазы на 1 г белка. При этом было показано, что добавление

© П. С. Астрелина, А. В. Казакова, 2024

DTT до конечной концентрации 0,5 мМ в растворе реакционной смеси значительно повышает ферментативную активность, в результате чего полный гидролиз белка наблюдается уже при соотношении 0,01 г телец на 1 г белка. Ulp1 входит в семейство цистеиновых протеаз, следовательно, ее каталитическая активность может быть увеличена путем добавления агентов, восстанавливающих S–S связи, например дитиотреитола.

Таким образом, в ходе работы была показана возможность использования свежеприготовленного солюбилизата Ulp1 для ферментативного гидролиза SUMO-гибридных белков. Решение имеет ряд преимуществ перед другими методами получения протеазы. Во-первых, рассмотренный метод позволяет быстро получить активный фермент с минимальным количеством затрачиваемых ресурсов. Во-вторых, в свежеприготовленных растворах соединение проявляет максимальную активность, что значительно снижает расход фермента. Кроме того, благодаря процедуре отмывки телец включения солюбилизат Ulp1 обладает достаточной степенью чистоты, в результате чего загрязнение целевого продукта минимально.

Полученные данные могут быть применены в области разработки технологических схем очистки рекомбинантных белков.

Литература

1. Linova M. Y. et al. A novel approach for production of an active N-terminally truncated Ulp1 (SUMO protease 1) catalytic domain from Escherichia coli inclusion bodies // Protein Expression Purification. 2020. Vol. 166. P. 105507.

2. Lau Y.-T. K. et al. Discovery and engineering of enhanced SUMO protease enzymes // J. Biol. Chem. 2018. Vol. 293, № 34. P. 13224–13233.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-49

ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ НА ПОВЕРХНОСТИ МАЛДИ-МИШЕНИ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ ОБРАЗОВАНИЯ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ

PHOTOCATALYTIC OXIDATION ON THE SURFACE OF A MALDI TARGET FOR RAPID ASSESSMENT OF THE FORMATION OF REACTIVE OXIDATION PRODUCTS OF XENOBIOTICS

А. А. Афанасьева[1], О. А. Кельциева[1,2], Е. П. Подольская[2]

[1]Научно-клинический центр токсикологии им. С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург
[2]Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

A. A. Afanasyeva[1], O. A. Keltsieva[1,2], E. P. Podolskaya[2]

[1]Golikov Research Center of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Saint Petersburg
[2]Institute of Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg

✉ afanasyeva.a.a.2000@yandex.ru

Аннотация

В рамках разработки экспрессных методов выявления реактивных метаболитов ксенобиотиков методом фотокаталитического окисления важным аспектом является подбор оптимального катализатора и условий проведения процесса. Проведен сравнительный анализ образцов диоксида титана (TiO_2) с различным фазовым составом в качестве фотокатализатора, а также определено оптимальное время проведения окисления.

Abstract

As part of the development of rapid methods for identifying reactive metabolites of xenobiotics using photocatalytic oxidation (PCO), an important point is the selection of the optimal catalyst and process conditions. A comparative analysis of titanium dioxide (TiO_2) samples with different phase compositions as a photocatalyst was carried out, and the optimal oxidation time was determined.

Токсичность, вызываемая лекарственными препаратами, является серьезной проблемой для развития фармакологии и медицины. Ксенобиотики и продукты их биотрансформации способны проявлять алкилирующие свойства, образуя аддукты с макромолекулами в организме, вызывая тем самым цитотоксическое и канцерогенное действие [1]. При разработке новых лекарственных средств одной из основных задач является исследование их метаболических путей с целью прогнозирования возможных токсических эффектов. Существует ряд подходов к моделированию биотрансформации ксенобиотиков, среди которых широкое распространение получил неферментативный метод УФ-индуцированного фотокаталитического окисления (УФ-ФКО), который обладает рядом преимуществ: высокой скоростью, низкими временными и ресурсными затратами [2]. Поэтому актуальной задачей является подбор оптимальных условий проведения УФ-ФКО. Цель исследования — сравнительный анализ образцов диоксида титана (TiO_2) с различным фазовым составом (с соотношением рутил : анатаз 100 : 0 %, 0 : 100 %, 20 : 80 % и 80 : 20 %) в качестве фотокатализатора процесса окисления ксенобиотика, а также определение оптимального времени проведения УФ-ФКО с использованием TiO_2 в качестве фотокатализатора (УФ/TiO_2-ФКО).

На первом этапе была проведена характеризация четырех образцов TiO_2. Элементный и фазовый состав исследуемых образцов подтверждены соответственно методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и рентгенофазового анализа. Посредством сканирующей электронной микроскопии было установлено, что размеры частиц всех порошков TiO_2 не превышали 1 мкм. Методом спектроскопии диффузного рассеяния света была определена ширина запрещенной зоны, вычисляемая из спектра как край поглощения коротковолновой полосы поглощения вещества.

В качестве модельного объекта исследования для установления оптимальных условий проведения эксперимента выбрали диуретический препарат с известными свойствами — индапамид (IPM), представляющий собой галогенсодержащее соединение с молекулярной формулой $C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$ и m/z 364,05 ($[M\text{-}H]^-$). Наличие реактивных метаболитов определяли по присутствию в масс-спектрах сигналов их аддуктов с улавливающим

© А. А. Афанасьева, О. А. Кельциева, Е. П. Подольская, 2024

агентом, в качестве которого был выбран глутатион (GSH). GSH — трипептид, который используется в качестве низкомолекулярной ловушки для детектирования реакционноспособных продуктов метаболизма ксенобиотиков [3].

Анализ активности используемых фотокатализаторов проводили методом МАЛДИ масс-спектрометрии. Эксперимент включал стадии функционализации поверхности МАЛДИ-мишени водными суспензиями TiO_2 (2 мг/мл), нанесения раствора ксенобиотика (50 мкг/мл) и раствора улавливающего агента GSH (100 мкг/мл) на функционализированные TiO_2 ячейки мишени, УФ-облучение (λ = 405 нм) в течение различных промежутков времени (1; 5; 10; 20; 30 и 40 мин), перенос раствора на соседнюю ячейку и добавление матрицы (2,5-дигидроксибензойная кислота).

Полученные результаты показали, что наибольшее количество аддуктов GSH с метаболитами IPM было обнаружено при проведении УФ/TiO_2-ФКО на поверхности МАЛДИ-мишени в следующих условиях: УФ-облучение в течение 30 мин и использование в качестве катализатора нанопорошка TiO_2 с соотношением полиморфных модификаций рутил : анатаз = 80 : 20 %. Стоит отметить, что оптимальная длина волны поглощаемого излучения выбранного катализатора также наиболее приближена к длине волны излучения используемой УФ-лампы.

Таким образом, УФ/TiO_2-ФКО на поверхности МАЛДИ-мишени с последующим масс-спектрометрическим анализом позволяет проводить быструю оценку образования реактивных метаболитов ксенобиотиков, в том числе короткоживущих, благодаря объединению нескольких стадий эксперимента. Усовершенствование этой методики может поспособствовать созданию эффективного предварительного этапа оценки токсичности лекарственных средств.

Литература

1. Савельева Е. И., Корягина Н. Л., Орлова О. И. Определение аддуктов отравляющих веществ с биомолекулами как биомаркеров экспозиции/эффекта // Медицина экстремальных ситуаций. 2018. Т. 20 (3). С. 451–453.

2. Hynjoo L., Wonyong C. Photocatalytic oxidation of arsenite in TiO_2 suspension: kinetics and mechanisms // Environ. Sci. Technol. 2002. Vol. 17. P. 3872–3878.

3. Gavlik M., Skibiński R., Trawiński J. et al. Photocatalysis combined with chromatographic methods as a new promising tool in drug metabolism studies — a review // Acta Chromatogr. 2018. Vol. 30 (1). P. 1–8.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-50

РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЫ «РОГОВИЦА-НА-ЧИПЕ»

DEVELOPMENT OF THE MICROFLUIDIC SYSTEM “CORNEA-ON-A-CHIP”

Т. И. Биккузин[1], Р. Р. Язгарова[1], Ш. Р. Рахматуллин[1], М. Ф. Галаутдинов[1], Р. Ф. Гизатулин[1,2], Ф. Ф. Кильмухаметов[1]

[1] Башкирский государственный медицинский университет, Уфа
[2] Институт механики им. Р. Р. Мавлютова УФИЦ РАН, Уфа

T. I. Bikkuzin[1], R. R. Yazgarova[1], Sh. R. Rakhmatullin[1], M. F. Galautdinov[1], R. F. Gizatullin[1,2], F. F. Kilmuhametov[1]

[1] Bashkir State Medical University, Ufa
[2] Mavlyutov Institute of Mechanics, Ufa Centre RAS, Ufa

✉ timur@bikkuzin.ru

Аннотация

3D-модель роговицы *in vitro*: «Роговица-на-чипе», имитирующая роговичную оболочку глаза человека и наиболее точно воссоздающая сложные локальные биофизиологические процессы в организме человека. В процессе разработки применяются технологии: микрофлюидики, стереолитографии и биоинженерии. Подобные устройства «Роговица-на-чипе» могут быть использованы для медико-биологических исследований и фармакологических испытаний лекарственных веществ, что потенциально снизит необходимость использовать животных в лабораторных исследованиях и повысит качество исследований.

Abstract

3D model of the cornea in vitro: “Cornea-on-a-Chip”, simulating the cornea of the human eye and most accurately recreating complex local biophysiological processes in the human body. Technologies used in the development process include microfluidics, sterolithography and bioengineering. Such “Cornea-on-a-Chip” devices could be used for biomedical research and pharmacological testing of drugs, potentially reducing the need to use animals in laboratory research and improving the quality of research.

Научный интерес к применению микрофлюидных систем в медицине и биологии за последние десятилетия вырос. Подобные системы применяются для создания 3D-биомоделей органов и тканей, которые способны воссоздавать биофизиологические условия и дают возможность контролировать микросреду вокруг тканей. В отличие от классических методов культивирования на пластике, микрофлюидные системы создают динамический поток жидкости, обеспечивая равномерное распределение питательных элементов и удаление клеточного дебриса внутри системы. Благодаря непрерывной перфузии поддерживается жизнеспособность и функциональность клеток в течение длительного времени, что имитирует процессы метаболизма *in vivo*. Точное воспроизведение сложных процессов вокруг клеток в организме на базе микрофлюидной системы позволяет конструировать более достоверные клеточные 3D-модели *in vitro*, делая их более физиологичными для биомедицинских исследований и скрининга лекарств. Подобную микрофлюидную систему с использованием живых клеток человека принято называть «орган-на-чипе».

Одним из развивающихся направлений технологий «орган-на-чипе» является офтальмология. Так, например, свои разработки «роговицы-на-чипе» опубликовали научные коллективы из Университета Пенсильвании (США) [1], Шэньчжэньского института передовых технологий (Китай) [2], Гарвардской медицинской школы (США) [3], Университета Киото (Япония) [4]. Все представленные модели роговицы были созданы под задачи поиска лекарственных веществ для офтальмологии.

Целью нашей научной инициативы является создание функциональной модели «роговицы-на-чипе» на базе микрофлюидной системы, имитирующей ткань роговицы и потоки жидкости вокруг роговицы человека: водянистой влаги в передней камере глаза и слезы в глазной щели. Каркас «чипа» изготавливается методом мягкой фотолитографии из полидиметилсилоксана. Используя выделенные из человеческой кадаверной роговицы клетки, мы намерены заселить и культивировать их в чипе несколько дней. Ожидается, что после успешной

© Т. И. Биккузин, Р. Р. Язгарова, Ш. Р. Рахматуллин, М. Ф. Галаутдинов, Р. Ф. Гизатулин, Ф. Ф. Кильмухаметов, 2024

стадии культивации клеток в «чипе» прототип будет использован для экспериментов с офтальмологическими лекарственными средствами.

Литература

1. Dongeun D. H. et al. Multiscale reverse engineering of the human ocular surface // NatMed. 2019.
2. Zitong Y. et al. A human cornea-on-a-chip for the study of epithelial wound healing by extracellular vesicles // iScience. 2022.
3. Bai J. et al. A Method for Developing Novel 3D Cornea-on-a-Chip Using Primary Murine Corneal Epithelial and Endothelial Cells // Front. Pharmacol. 2020.
4. Abdalkader R. et al. Multi-corneal barriers-on-a-chip to recapitulate eye blinking shear stress forces // Lab Chip. 2020.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-51

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ НА РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ*

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ENDOPHYTIC BACTERIA ON THE GROWTH RATES OF SPRING WHEAT

Е. Е. Бородина, Ю. Р. Серазетдинова, Е. Р. Фасхутдинова, Н. Н. Богачёва, Н. В. Фотина, Л. К. Асякина

Кемеровский государственный университет

E. E. Borodina, Yu.R. Serazetdinova, E. R. Faskhutdinova, N. N. Bogacheva, N. V. Fotina, L. K. Asyakina

Kemerovo State University

✉ kborodina1908@gmail.com

Аннотация

Использование химикатов в сельском хозяйстве негативно влияет на экологию и здоровье человека. В связи с этим необходима разработка альтернативных подходов. Цель исследования — изучить влияние ростостимулирующих бактерий *Pantoea allii* SHv-2, *Raoultella ornithinolytica* SHv-5, *Pantoea ananatis* SHv-6 и их консорциума на ростовые показатели пшеницы. Установлено, что консорциум микроорганизмов увеличивает содержание пигментов в надземной части, а также улучшает рост пшеницы.

Abstract

The use of chemicals in agriculture has a negative impact on the environment and human health. In this regard, it is necessary to develop alternative approaches. The aim of the study was to study the effect of growth–stimulating bacteria *Pantoea allii* SHv-2, *Raoultella ornithinolytica* SHv-5, *Pantoea ananatis* SHv-6 and their consortium on wheat growth rates. It was found that the consortium of microorganisms increases the pigment content in the aboveground part, and also improves wheat growth.

Методы ведения сельского хозяйства в значительной степени основаны на использовании синтетических химических средств защиты и стимулирования роста растений. Активное использование химикатов приводит к деградации почв, снижению разнообразия микробиоты, формированию устойчивости фитопатогенов к пестицидам. Таким образом, возрастает потребность в разработке и внедрении новых устойчивых методов ведения сельского хозяйства [1].

Надежной заменой синтетических удобрений и средств защиты растений являются биопрепараты на основе ростостимулирующие микроорганизмов. Биоудобрения не являются источником питательных веществ, однако помогают растениям получать доступ к необходимым питательным веществам, присутствующим в ризосфере, путем фиксации атмосферного азота, минерализации и солюбилизации питательных веществ, выработки гормонов роста, тем самым повышая урожайность сельскохозяйственных культур экологически безопасным способом. Многие бактерии оказывают защитный эффект на растения в условиях биотического стресса путем продуцирования антибиотических веществ, сидерофоров и индицирования системной резистентности растений [2].

Цель исследования — изучить влияние ростостимулирующих бактерий *Pantoea allii*, *Raoultella ornithinolytica* и *Pantoea ananatis* и консорциум на их основе на ростовые показатели пшеницы.

Объектами исследования являлись яровая мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L. emend.) сорта «Сибирский Альянс», а также бактериальные штаммы (*Pantoea allii* SHv-2, *Raoultella ornithinolytica* SHv-5 и *Pantoea ananatis* SHv-6), выделенные на раннем этапе работы, и консорциум на их основе (соотношение микроорганизмов: 1 : 1 : 3 соответственно) [2].

Лабораторную апробацию бактериальных штаммов и консорциума проводили рулонным методом по ГОСТ 12038-84. Обработку семян осуществляли следующим образом:

– Контроль. Протравка семян дистиллированной водой, 10 л/т семян.

– Вариант 1. Протравка семян *Pantoea allii* SHv-2 (1×10^8 КОЕ/мл), 2 л/т.

– Вариант 2. Протравка семян *Raoultella ornithinolytica* SHv-5 (1×10^8 КОЕ/мл), 2 л/т.

* 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, Е. Р. Фасхутдинова, Н. Н. Богачёва, Н. В. Фотина, Л. К. Асякина, 2024

– Вариант 3. Протравка семян *Pantoea ananatis* SHv-6 (1 × 10^8 КОЕ/мл), 2 л/т.

– Вариант 4. Протравка семян консорциумом (1 × 10^8 КОЕ/мл), 2 л/т.

Содержание хлорофилла и каротиноидов в сухой массе наземной части определяли по методике, описанной в раннее опубликованной работе [3].

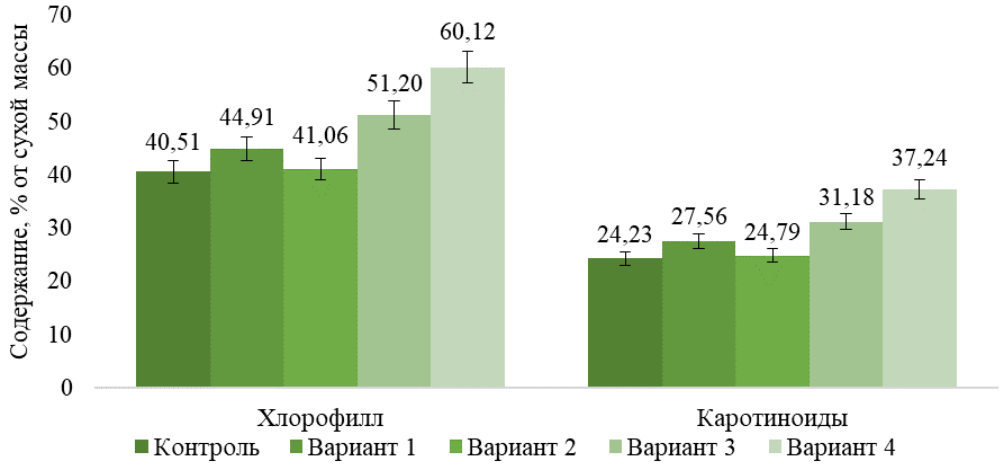
Результаты исследования энергии прорастания, всхожести, длины корня и ростка представлены в таблице.

Лабораторная апробация пшеницы

Вариант обработки	Энергия прорастания, %	Всхожесть, %	Длина корня, мм	Длина ростка, мм
Контроль	44,6 ± 2,5	84,4 ± 2,4	153 ± 4	179 ± 3
Вариант 1	59,4 ± 1,6	87,2 ± 2,7	164 ± 3	192 ± 2
Вариант 2	53,7 ± 2,1	86,4 ± 3,2	162 ± 3	189 ± 2
Вариант 3	66,5 ± 3,3	90,6 ± 4,3	166 ± 2	197 ± 3
Вариант 4	70,5 ± 2,2	92,3 ± 3,1	171 ± 4	202 ± 4

Статистически значимыми результатами являлись энергия прорастания во всех вариантах, длина ростка в 1, 3 и 4-м вариантах опыта, а также длина корня в 4-м варианте.

Результаты определения содержания хлорофилла и каротиноидов в наземной части представлены на рисунке.



Содержание хлорофилла и каротиноидов
в сухой массе наземной части с планкой погрешности, %

Все варианты опыта превышали по данным значениям контрольный, наилучшим оказался консорциум. Полученные данные согласуются с результатами других ученых. Так, A. Suman и соавторы отметили, что эти микроорганизмы рода *Pantoea* способны интенсифицировать рост зерновых культур [4]. Ростостимулирующие свойства представителей *Raoultella* также описаны в современной научной литературе. Например, штамм *Raoultella planticola* YL2 способствовал улучшению роста кукурузы [5].

Таким образом, консорциум на основе штаммов *Pantoea allii* SHv-2, *Raoultella ornithinolytica* SHv-5 и *Pantoea ananatis* SHv-6 в соотношении 1 : 1 : 3 стимулирует рост и развитие яровой мягкой пшеницы в лабораторных условиях. В связи с этим бактериальный консорциум может стать основой новых биологических удобрений для повышения продуктивности сельскохозяйственных культур.

Литература

1. Faskhutdinova E. R., Fotina N. V., Neverova O. A. et al. Assessment of the ability of extremophilic microorganisms to stimulate the growth and development of agricultural seeds // Foods Raw Mater. 2024. Vol. 12, № 2. P. 348–360.

2. Асякина Л. К., Исачкова О. А., Колпакова Д. Е. и др. Влияние микробного консорциума на рост и развитие ярового ячменя в условиях Кемеровской области — Кузбасса // Зерновое хозяйство России. 2024. Т. 1, № 1. С. 104–112.

3. Серазетдинова Ю. Р., Фотина Н. В., Асякина Л. К. и др. Роль *Bacillus amyloliquefaciens* в снижении абиотического стресса зерновых культур // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. 2023. Т. 64, № 4. С. 178–183.

4. Suman A., Shukla L., Marag P. S. et al. Potential use of plant colonizing Pantoea as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops // J. Environ. Biol. 2020. Vol. 41. P. 987–994.

5. Gou W., Zheng P., Chen F. et al. Accumulation of choline and glycinebetaine and drought stress tolerance induced in maize (zea mays) by three plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) strains // Pakistan J. Botany. 2015. Vol. 42, № 2. P. 581–586.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-52

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ АЗОТОФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ*

THE ELABORATION OF A HIGHLY EFFECTIVE MICROBIOLOGICAL FERTILISER BASED ON STRAINS OF NITROGEN-FIXING BACTERIA

Г. С. Бошляков, Е. В. Гришина, А. О. Пайбердин, Д. В. Пак,
А. М. Петрова, Е. М. Родионов, И. А. Юрина, М. С. Золотарева

Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва

G. S. Boshlyakov, E. V. Grishina, A. O. Paiberdin, D. V. Pak,
A. M. Petrova, E. M. Rodionov, I. A. Yurina, M. S. Zolotareva

Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow

✉ grigori200328@gmail.com

Аннотация

Минеральные удобрения теряют эффективность, ее можно повысить добавлением микробиологических удобрений. Выделены и охарактеризованы 6 штаммов бактерий, изучен их агрономический потенциал. Оптимизирована плотная питательная среда. Обнаружено 2 штамма, вступающие в антагонистические отношения с *P. chlororaphis* 449. Определена видовая принадлежность штаммов методами спектрометрии и секвенирования по Сенгеру.

Abstract

Mineral fertilizers lose their effectiveness. It improved by adding microbiological fertilizers. Six bacterial strains were isolated and characterized, and their agronomic potential was studied. A dense nutrient medium was optimized. Two strains were found to enter into antagonistic relationships with *P. chlororaphis* 449. Spectrofluorometry showed the accumulation of siderophores. Strains were determined using spectrometry and Sanger sequencing methods.

На сегодняшний день минеральные удобрения широко распространены. Однако их использование сопряжено с рядом недостатков. Так, неконтролируемое применение удобрений приводит к засаливанию и эрозии почвы, минеральные удобрения вымываются и попадают в грунтовые воды и могут вредить организмам симбионтам. В результате их продолжительного применения на посевных территориях количество удобрений достигло предельно допустимых значений, из-за чего повышение концентрации практически не влияет на урожайность сельскохозяйственных культур, с такой проблемой уже столкнулся Китай [1]. Применение же микробиологических удобрений сочетает в себе высокую эффективность и экологичность: способствует росту растений и восстановлению почвы, а также повышает усвояемость минеральных удобрений, препятствует развитию фитопатогенных организмов.

В ходе работы из образцов почвы Ботанического сада РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева было получено 6 чистых культур азотфиксирующих бактерий, способных к фитостимуляции. Изучены их макро- и микроморфологические свойства, подобраны оптимальные субстраты для роста и культивирования. Культуры на агаре представляют собой бесцветные слизистые колонии округлой формы с диаметром от 1 до 5 мм, клетки — грамотрицательные неспорообразующие бациллы, способные образовывать покоящиеся формы.

Были выполнены опыты, направленные на изучение агрономического потенциала микроорганизмов в качестве удобрений. При проведении эксперимента семена огурцов Либелле F1 замачивались в суспензии микроорганизмов, а затем высаживались в землю (выборка производилась из 160 семян, по 20 на каждый штамм, 20 на контроль и 20 на препарат «Азотовит®»). В результате эксперимента была проведена оценка фитостимулирующей активности, показавшая, что все обнаруженные штаммы, ассоциированные с *Quercus robur, Ficus carica, Fabaceae spp., Sorbus aucuparia, Monstera deliciosa, Aucuba japonica,* способствуют ускоренному прорастанию семян, раннему появлению истинных листьев и увеличению стебля растения. Полученные данные по развитию

* Исследование выполнено при поддержке гранта «Акселератор 4.0 РТУ МИРЭА вторая волна».

© Г. С. Бошляков, Е. В. Гришина, А. О. Пайбердин, Д. В. Пак, А. М. Петрова, Е. М. Родионов, И. А. Юрина, М. С. Золотарева, 2024

ростков подтверждают преимущество выделенных микроорганизмов перед препаратом «Азотовит®», что делает их перспективными компонентами для биоудобрения.

Была оптимизирована плотная питательная среда для культивирования выделенных чистых культур с помощью добавления к ней отвара бобовых, что может быть использовано в дальнейшем производстве при подготовке инокулята культуры перед культивированием в биореакторе.

Обнаружено, что штаммы, ассоциированные с *S. aucuparia*, *Fabaceae spp.*, вступают в антагонистические отношения с фитопатогенной бактерией *P. chlororaphis*. Все культуры накапливают сидерофоры — родственники азотобактина в ответ на антигены *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtillis*, *P. chlororaphis*. Регистрация спектров флуоресценции происходила при длине волны 490 нм на анализаторе жидкости «Флюорат-02-Панорама» (спектрофлуориметр). По результатам спектрофлуориметрии были получены спектры испускания данных образцов, на которых наблюдался пик при длине волны 350 нм, что соответствует литературным данным по азотобактину. Эти штаммы являются перспективными агентами биоконтроля сельскохозяйственных культур [2].

Методом времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией на приборе MALDI-TOF MS с высокой достоверностью было определено, что два исследуемых штамма относятся к *A. radiobacter*. Используя данные штаммы, можно разработать новые устойчивые к внешним факторам сельскохозяйственные культуры [3].

Методом секвенирования по Сэнгеру, проведенным компанией «Евроген» на генетическом анализаторе 3500xL Applied Biosystems, с высокой достоверностью определены виды выделенных бактерий. Так, штамм, ассоциированный с *F. spp.*, является *Ancylobacter defluvii, M. deliciosa — Agrobacterium radiobacter, F. carica — Agrobacterium sp., A. japonica — Agrobacterium sp.*

Литература

1. Textor C. Consumption of agricultural fertilizers in China from 2014 to 2021, by nutrient. URL: https://www.statista.com/statistics/1330039/fertilizer-consumption-by-nutrient-china/

2. Li K., Guo Y. et al. A transient transformation system for gene characterization in upland cotton (Gossypium hirsutum) // Plant Methods. 2018. Vol. 14. P. 50.

3. Sumbul A. et al. Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management // Saudi J. Biol. Sci. 2020. Vol. 27, No. 12.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-53

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

COMPARATIVE EVALUATION OF METHODS FOR THE CONTROL OF BACTERIAL ENDOTOXINS IN IMMUNOBIOLOGICAL MEDICINES

М. В. Булатова, С. В. Усова, Е. С. Башкина, Н. С. Куцерубова, М. П. Богрянцева

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

M. V. Bulatova, S. V. Usova, E. S. Bashkina, N. S. Kutserubova, M. P. Bogryantseva

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ mari.bulatova.90@mail.ru

Аннотация

Несмотря на то что список пирогенов довольно обширен, в области контроля качества инъекционных лекарственных средств практическое значение имеют главным образом пирогены, вырабатываемые грамотрицательными бактериями, — бактериальные эндотоксины [1]. Их значительное присутствие в готовых лекарственных инъекционных формах и активных фармацевтических субстанциях может оказывать существенное воздействие на организм человека, вызывая аллергические и воспалительные реакции, повреждение тканей, и даже может приводить к серьезным нарушениям биохимических процессов. Согласно требованиям международного и отечественного стандарта, содержащего свод правил безопасного и качественного изготовления лекарственных средств, количество пирогенных примесей в инъекционных лекарственных препаратах должно быть сведено к минимуму [2]. Необходимый контроль за уровнем этих примесей может быть осуществлен с помощью трех методов: теста на пирогенность с использованием животных — кроликов [3], ЛАЛ-теста [4] и теста активации моноцитов [5], который методически еще требует дополнительных исследований и валидации. Наиболее распространенными методами контроля в лабораториях являются пирогенность и ЛАЛ-тест.

Abstract

Despite the fact that the list of pyrogens is quite extensive, in the field of quality control of injectable medicines, pyrogens produced by gram–negative bacteria — bacterial endotoxins are mainly of practical importance [1]. Their significant presence in ready-made injectable dosage forms and active pharmaceutical substances can have a significant effect on the human body, causing allergic and inflammatory reactions, tissue damage and can even lead to serious violations of biochemical processes. According to the requirements of the international and domestic standard, which contains a set of rules for the safe and high-quality manufacture of medicines, the amount of pyrogenic impurities in injectable medicines should be minimized [2]. The necessary control over the level of these impurities can be carried out using three methods: a pyrogenicity test using rabbit animals [3], a LAL test [4] and a monocyte activation test [5], which methodically still requires additional research and validation. The most common control methods in laboratories are pyrogenicity and LAL test.

Целью данного исследования являлось сравнение метода определения пирогенности с использованием животных и ЛАЛ-теста для контроля бактериальных эндотоксинов в вакцинах, полученных генно-инженерным методом.

Определение бактериальных эндотоксинов проводилось с использованием экспериментальных серий вакцин. Во всех исследуемых образцах тест на пирогенность показал, что вакцины апирогенны и не вызывают серьезных аллергических или воспалительных реакций у кроликов. ЛАЛ-тест показал результат ниже верхней границы порогового пирогенного предела для нормальной переносимости организмом 350 ЕЭ/доза. Таким образом, с помощью теста на пирогенность удалось определить действие обоих классов пирогенов: экзо- и эндотоксинов. ЛАЛ-тест в свою очередь показал наличие бактериальных эндотоксинов в пределах нормы для подтверждения безопасности экспериментальных вакцин.

Несмотря на высокую чувствительность, которая составляет 0,005 ЕЭ/мл, ЛАЛ-тест специфичен только к выявлению эндотоксинов, а все виды пирогенных примесей определяются методом контроля пирогенности на кроликах или на моноцитах крови человека. При этом чувствительность метода пирогенности на кроликах го-

© М. В. Булатова, С. В. Усова, Е. С. Башкина, Н. С. Куцерубова, М. П. Богрянцева, 2024

раздо меньше, чем в ЛАЛ-тесте. Таким образом, тест на пирогенность и ЛАЛ-тест можно считать однонаправленными, так как оба теста определяют пирогенные примеси. Однако при разработке новых вакцин для подтверждения безопасности допускается проводить оба метода с последующим включением в нормативную документацию на препарат.

Литература

1. Шаповалова О. В., Неугодова Н. П., Гунар О. В. Практические аспекты анализа фармацевтических субстанций по показателю «Бактериальные эндотоксины» // Науч. результаты биомед. исслед. 2019. № 2.

2. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. М.: Стандартинформ, 2009. 139 с.

3. Thurman T. L., Lahti C. J., Mateffy J. M. et al. Comparison of pyrogen assays by testing products exhibiting low endotoxin recovery // ALTEX. 2023. Vol. 40 (1). P. 117–124.

4. Grallert H., Leopoldseder S., Schuett M. et al. Endo LISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection // Nat. Methods. Appl. Notes. 2011. 3–5.

5. Brown J., Clippinger A. J., Fritz Briglia C. et al. Using the monocyte activation test as a stand-alone release test for medical devices // ALTEX. 2021. Vol. 38 (1). P. 151–156.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-54

ПОИСК И АНАЛИЗ МУТАНТНЫХ ФОРМ СУБТИЛИЗИНА E ИЗ *BACILLUS SUBTILIS*: ОПТИМИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЗАРЯД-ЗАРЯДОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ТОЧКУ БЕЛКА

SEARCH AND ANALYSIS OF MUTANT FORMS OF SUBTILISIN E FROM BACILLUS SUBTILIS: OPTIMIZATION OF SURFACE CHARGE-CHARGE INTERACTIONS AND THEIR EFFECT ON THE ISOELECTRIC POINT OF THE PROTEIN

А. А. Величко, Г. Д. Миловидов, М. П. Шевелёва, В. А. Немашкалов

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино

A. A. Velichko, G. D. Milovidov, M. P. Shevelyova, V. A. Nemashkalov

Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino

✉ vaconf13@yandex.ru

Аннотация

Для субтилизина E из *Bacillus subtilis* был проведен *in silico* анализ мутантных форм, полученных путем оптимизации его заряд-зарядовых взаимодействий, и оценен эффект этих мутаций на изоэлектрическую точку белка. Остатки Glu61 и Asp166 были заменены на Lys, а остатки Lys71 и Lys343 — на Asp. Все замены, за исключением Lys71Asp, способствовали повышению стабильности молекулы. Изоэлектрическая точка белка зависела только от его суммарного заряда.

Abstract

For subtilisin E from *Bacillus subtilis* an *in silico* analysis of mutant forms, obtained by optimizing its charge-charge interactions, was carried out. The effect of these mutations on the isoelectric point was assessed. Residues Glu61 and Asp166 were replaced by Lys, Lys71 and Lys343 by Asp. All substitutions, with the exception of Lys71Asp, increased the stability of the molecule. The isoelectric point of a protein depended only on its total charge.

Субтилизин E, продуцируемый *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Bacillus licheinformis* и *Bacillus pumilus*, относится к классу сериновых протеаз [1]. Субтилизины — универсальные протеазы, они находят промышленное применение в производстве моющих и косметических средств, обработке шерсти и кожи, фармацевтической промышленности [2, 3]. Увеличение стабильности является одной из основных задач при работе с этими ферментами, поскольку это позволяет применять их при более высоких температурах, что повышает скорость катализируемых реакций. С другой стороны, изменения в изоэлектрической точке в процессе мутаций могут привести к уменьшению эффективности фермента. В данной работе был проведен *in silico* анализ мутантных форм субтилизина E из *Bacillus subtilis*, полученных путем оптимизации его поверхностных заряд-зарядовых взаимодействий, и оценено влияние этих мутаций на изоэлектрическую точку и стабильность белка.

Структура субтилизина E организма *Bacillus subtilis* (UniProt ID: P04189) была взята из Protein Data Bank (https://www.rcsb.org/), PDB ID: 3WHI. Вклад в изменение энергии Гиббса белка, обусловленный заряд-зарядовыми взаимодействиями, ΔG_{qq}, вычислялся с помощью программы TKSA-MC (*Tanford-Kirkwood Solvent Accessibility model with the Monte Carlo method*) (https://github.com/contessoto/tksamc) при pH 8,0 и 27 °C [4]. На дестабилизирующий вклад в структуру белка ионизированных аминокислотных остатков указывает значение $\Delta G_{qq} > 0$ и SASA > 50 % (*Solvent-Accessible Surface Area* — площадь поверхности остатка, доступная растворителю) [5]. Структуры мутантных форм белка были получены с помощью программы AlphaFold 2 (https://www.alphafold.ebi.ac.uk) [6]. Изоэлектрическая точка (pI) белка и его мутантов была рассчитана по их первичной последовательности с помощью веб-сервисов Protein Calculator (https://protcalc.sourceforge.net/), Compute pI/Mw (https://web.expasy.org/compute_pi/) и Protein Parameters (https://www.protparam.net/index.html) [7, 8]. Нумерация остатков приведена в соответствии с последовательностью UniProt.

Анализ профиля ΔG_{qq} субтилизина E показал, что аминокислотные заряженные поверхностные остатки Glu61, Lys71, Asp166 и Lys343 дестабилизируют белок. Для Glu61, Lys71 и Asp166 это обусловлено нахождением в плотном электростатическом окружении, а для Lys343 — электростатическим отталкиванием

© А. А. Величко, Г. Д. Миловидов, М. П. Шевелёва, В. А. Немашкалов, 2024

от His344. Инверсия зарядов путем замены этих остатков, предположительно, приведет к увеличению стабильности белка. Для кислотных остатков была проведена замена на лизин, а для лизина — на аспарагиновую кислоту. Для каждой мутации была рассчитана изоэлектрическая точка и проведено сравнение ее с диким типом. Замены Glu61Lys, Asp166Lys и Lys343Asp привели к значительному повышению стабильности белка ($\Delta\Delta G_{Glu61Lys}$ = −12,71 кДж/моль, $\Delta\Delta G_{Asp166Lys}$ = −3,27 кДж/моль, $\Delta\Delta G_{Lys343Asp}$ = −8,61 кДж/моль). Мутация Lys71Asp дестабилизировала молекулу ($\Delta\Delta G_{Lys71Lys}$ = 16,36 кДж/моль). Сочетание мутаций значительно увеличило их эффект ($\Delta\Delta G_{Asp61Lys+Asp166Lys}$ = −4,36 кДж/моль, $\Delta\Delta G_{Asp61Lys+Asp343Lys}$ = −24,29 кДж/моль, $\Delta\Delta G_{Asp166Lys+Asp343Lys}$ = −20,45 кДж/моль, $\Delta\Delta G_{Asp61Lys+Asp166Lys+Asp343Lys}$ = −33,66 кДж/моль). Введение множественной мутации Asp61Lys + Asp166Lys + + Asp343Lys привело к тому, что значимо увеличился дестабилизирующий эффект остатка Lys56 на структуру белка. Его замена на аспарагиновую кислоту приводила к повышению стабильности белка ($\Delta\Delta G$ = −40,69 кДж/моль). Изменения в изоэлектрической точке белка зависели только от конечного суммарного заряда мутантного белка. Точечные замены отрицательно заряженных остатков на лизин изменяли pI с 8,74 до 9,04, а Lys71Asp — с 8,74 до 7,98. Мутации Glu61Lys + Lys343Asp, Asp166Lys + Lys343Asp и Lys56Asp + Glu61Lys + Asp166Lys + + Lys343Asp не влияли на изоэлектрическую точку белка.

Таким образом, в данной работе был проведен анализ влияния заряженных аминокислотных остатков субтилизина Е на изменение энергии Гиббса молекулы ΔG_{qq}. Были выбраны мутации, потенциально приводящие к повышению стабильности фермента, и оценено их влияние на изоэлектрическую точку белка. Значение изоэлектрической точки белка зависело только от его суммарного заряда. Наблюдаемый эффект может быть объяснен тем, что количество ионизируемых групп в белке является основным показателем значения изоэлектрической точки, выражающей электростатические свойства всей молекулы, в то время как изменения в заряд-зарядовых взаимодействиях сосредоточены в основном вокруг заменяемых остатков. Полученные результаты будут в дальнейшем использованы для дизайна мутантных форм повешенной стабильности субтилизина Е.

Литература

1. Zolfaghari Emameh R., Kazokaitė J., Yakhchali B. Bioinformatics analysis of extracellular subtilisin E from Bacillus subtilis // J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. Vol. 40, № 16. P. 7183–7190.

2. Tang H. et al. Insight into subtilisin E-S7 cleavage pattern based on crystal structure and hydrolysates peptide analysis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. Vol. 512, № 3. P. 623–628.

3. Azrin N.A.M. et al. Versatility of subtilisin: A review on structure, characteristics, and applications // Biotech. App. Biochem. 2022. Vol. 69, № 6. P. 2599–2616.

4. Contessoto V.G. et al. TKSA-MC: A web server for rational mutation through the optimization of protein charge interactions // Proteins. 2018. Vol. 86, № 11. P. 1184–1188.

5. Loladze V.V. et al. Engineering a Thermostable Protein via Optimization of Charge-Charge Interactions on the Protein Surface // Biochem. 1999. Vol. 38, № 50. P. 16419–16423.

6. Mirdita M. et al. ColabFold: making protein folding accessible to all // Nat. Methods. 2022. Vol. 19, № 6. P. 679–682.

7. Bjellqvist B. et al. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions // Electrophoresis. 1994. Vol. 15, № 1. P. 529–539.

8. Bjellqvist B. et al. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences // Electrophoresis. 1993. Vol. 14, № 1. P. 1023–1031.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-55

ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *HEDYSARUM NEGLECTUM* LEDEB *

HYPOLIPIDEMIC POTENTIAL OF *HEDYSARUM NEGLECTUM* LEDEB

А. Д. Веснина, А. Ю. Просеков

Кемеровский государственный университет

A. D. Vesnina, A. Y. Prosekov

Kemerovo State University

✉ koledockop1@mail.ru

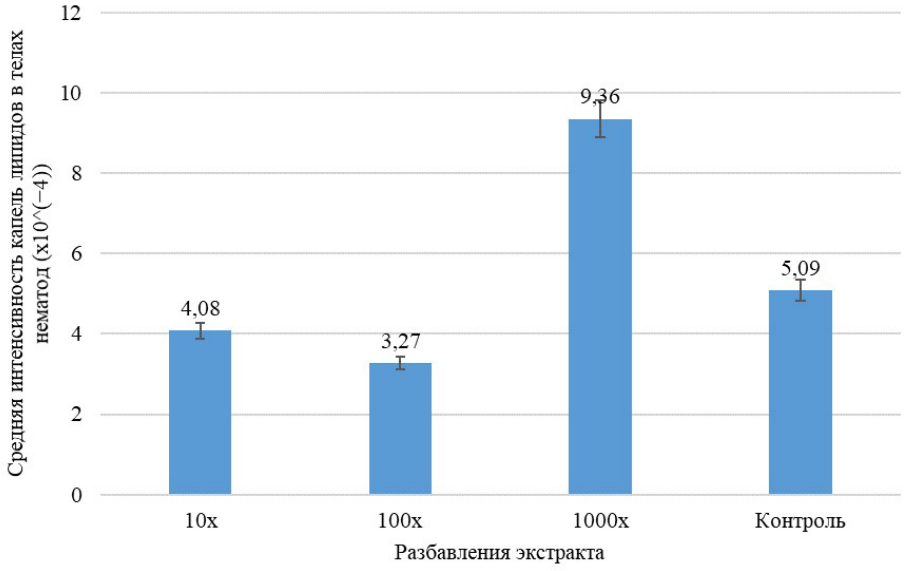
Аннотация

Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) — приоритетное направление в современной системе здравоохранения. Одним из эффективных профилактических мероприятий является правильное питание, в частности обогащение рациона биологически активными веществами с потенциалом к регулированию липидного обмена (одного из факторов риска развития ССЗ). Данная работа направлена на изучение потенциала экстракта копеечника забытого влиять на липидные включения в телах нематод.

Abstract

Prevention of cardiovascular diseases (CVD) is a priority in the modern healthcare system. One of the effective preventive measures is proper nutrition, in particular, enriching the diet with biologically active substances with the potential to regulate lipid metabolism (one of the risk factors for the development of CVD). This work is aimed at studying the potential of the extract of the forgotten penennel to influence lipid inclusions in the bodies of nematodes.

Современные темпы и условия жизни (неправильное питание, нарушенный режим сна, отсутствие/недостаток физической активности, экологическая обстановка и т. п.) способствуют развитию социально значимых заболеваний, в частности сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). ССЗ занимают лидирующие позиции в причинах смертности населения, что увеличивает потери трудоспособного населения. Одним из факторов риска развития ССЗ является повышенный уровень холестерина (дислипидемия). Следовательно, актуальны профилакти-



Влияние экстракта *H. neglectum* в различных разведениях

* Исследование выполнено в рамках государственного задания (проект FZSR-2024-0008).

© А. Д. Веснина, А. Ю. Просеков, 2024

ческие мероприятия, направленные на нормализацию липидного обмена, например через систематический прием (обогащение рациона питания) функциональных пищевых продуктов (ФПП), биологически активных добавок (БАД) [1], содержащих в своем составе растительные компоненты с гиполипидемическим потенциалом [2].

В ранее проведенных авторами исследованиях установлено, что копеечник забытый (*Hedysarum neglectum* Ledeb) является перспективным растительным объектом, содержащим метаболиты, влияющие на обмен липидов [3].

Данное исследование направлено на изучение потенциала экстракта *H. neglectum* (при 10-, 100- и 1000-кратных разведениях стерильной дистиллированной водой) влиять на накопление липидных фракций в телах нематод (*Caenorhabditis elegans* штамм N2 Bristol). Для оценки влияния экстрактов на накопление липидных фракций использовали флуоресцентное окрашивание липидных включений с помощью реагента BDP 505/515 — бордипиррометенового флуорофора (*Lumiprobe*, Россия) для визуализации липидных мембран. Параметры получения экстракта отражены в работе [3], этапы исследования на нематодах — [4].

Результаты оценки способности экстракта *H. neglectum* влиять на накопление липидных фракций в телах нематод отражены на рисунке.

В результате установлено, что наибольшая способность снижать накопления липидных фракций по отношению к контролю (в нематодах, не обработанных тестируемыми соединениями) характерна для экстрактов при разбавлении 100х и 10х. Добавление экстракта в разбавлении 1000х, наоборот, стимулировало накопление липидных включений. При добавлении экстракта, разбавленного в 10 раз, наблюдалось уменьшение интенсивности флуоресценции по отношении к контролю в 1,25 раза, для экстракта, разбавленного в 100 раз, — в 1,56 раза. Предположительно, данная активность обусловлена наличием в составе экстракта кверцетина [5].

В ходе исследования установлено, что экстракт *H. neglectum* проявляет потенциал, связанный со снижением уровня липидных фракций в телах нематод. Следовательно, потенциально экстракт можно вводить в рецептуру БАД, ФПП профилактической направленности, но после проведения дополнительных исследований с использованием более сложных модельных организмов.

Литература

1. Веснина А. Д., Милентьева И. С., Дмитриева А. И. и др. Перспективы применения Hedysarum neglectum ledeb в качестве кардиопротектора // АПК России. 2023. Т. 30, № 5. С. 677–682.

2. Погожева А. В., Дербенева С. А. Питание в коррекции дислипидемии. Санкт-Петербург: Наукоемкие технол., 2022. 208 с.

3. Vesnina A., Milentyeva I., Minina V. et al. Evaluation of the In Vivo Anti-Atherosclerotic Activity of Quercetin Isolated from the Hairy Roots of Hedysarum neglectum Ledeb // Life. 2023. Vol. 13, No. 8. P. 1706.

4. Faskhutdinova E. R. et al. Effects of bioactive substances isolated from Siberian medicinal plants on the lifespan of Caenorhabditis elegans // Foods Raw Mater. 2022. No. 2 (10). P. 340–352.

5. Vesnina A. D., Milentyeva I. S., Le V. M. et al. Quercetin isolated from Hedysarum neglectum Ledeb. as a preventer of metabolic diseases // Foods Raw Mater. 2025. No. 13 (1). P. 192–201.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-56

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ЯИЦ МУРАВЬЕВ *

ASSESSMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF ANT EGG EXTRACTS

А. А. Власова, О. Е. Липатова, Т. Ю. Тельнова, М. М. Моргунова, С. С. Шашкина, Д. В. Аксёнов-Грибанов

Иркутский государственный университет

A. A. Vlasova, O. E. Lipatova, T. Yu. Telnova, M. M. Morgunova, S. S. Shashkina, D. V. Axenov-Gribanov

Irkutsk State University

✉ anfi98@bk.ru

Аннотация

В рамках исследования было выявлено, что экстракты, полученные из яиц муравьев, обладали ростостимулирующей активностью в отношении *Chlorella vulgaris*, антимикробной и антиоксидантной активностями.

Abstract

The study revealed that the extracts obtained from ant eggs had biological activity with respect to affecting the growth performance of *Chlorella vulgaris*; they also had antimicrobial and antioxidant activities.

Муравьи (Formicidae) представляют собой группу социальных насекомых, встречающихся во всех наземных экосистемах. Механизм защиты муравьев от различных естественных врагов и патогенов осуществляется за счет поведенческих особенностей, химической и иммунной защиты. Известно, что у муравьев самое большое количество экзокринных желез, большинство из которых используется для защиты от патогенов. В научной литературе чаще всего упоминаются метаплевральные, мандибулярные, ядовитые железы и железы Дюфура. В настоящее время проводятся исследования, направленные на изучение химического состава и антибиотического потенциала железистых выделений муравьев. При этом биотехнологическим потенциалом могут обладать не только муравьи, но и их яйца, поскольку яйца муравьев так же, как и их взрослые особи, могут содержать биологически активные вещества. Таким образом, целью данного исследования является оценка биологической активности экстрактов яиц муравьев в отношении ростостимулирующих, антимикробных и антиоксидантных свойств.

Экстракцию яиц муравьев проводили метанолом. В чистую пробирку объемом 50 мл, содержащую высушенные яйца, весом 1,8 г, добавляли 5 мл растворителя и перемешивали в течение 10 мин на шейкере (JOAN LAB Rotating Mixer RML-80, Китай). Далее образцы центрифугировали 10 мин при 4 000 rpm (DM 0412 Hettich, США) и отбирали верхнюю фазу в чистую пробирку. Экстракцию проводили трехкратно и фракции объединяли. Активность полученных экстрактов оценивали в отношении воздействия на показатели роста *Chlorella vulgaris*. Вместе с тем проводили оценку антибактериальной и антиоксидантной активности.

Прирост биомассы водоросли *C. vulgaris* оценивали методом измерения оптической плотности спустя 3, 6 и 9 суток от начала культивирования спектрофотометрическим методом (ПЭ-5300В, ПромЭкоЛаб, Россия) при длине волны 560 нм. Для оценки прироста культуры водоросли в конические колбы объемом 50 мл добавляли метанольные экстракты в объеме 0,5 и 1,5 мл. Растворитель выпаривали, к сухому остатку добавляли 40 мл водного раствора культуры водоросли *C. vulgaris* со значением оптической плотности 0,06. Культивацию проводили при температуре 36 °С. Оценку достоверности различий проводили с применением t-критерия при $p < 0,05$.

Оценку антимикробной активности проводили с применением диско-диффузионного метода в отношении 18 модельных тест-культур. Для этого метанольный экстракт яиц муравьев наносили на диски в объеме 40 мкл и высушивали. Далее диски наносили на твердые питательные среды с бактериальными и грибными тест-культурами, чашки Петри помещали в термостат (СПУ ТС-1/20, СКТБ СПУ, Россия) и инкубировали в течение суток.

Качественную оценку антиоксидантной активности проводили с применением метода DPPH. В лунки планшета наносили 10 мкл анализируемого экстракта и 90 мкл DPPH. Планшет оставляли в темноте на 30 мин с последующим анализом развития окраски проб. Переход окраски с розовой на оранжевую свидетельствовал о наличии в пробе антиоксидантов.

* Исследование выполнено при финансовой Минобрнауки России (FZZE 2024-0011 и FZZE 2024-0003).

© А. А. Власова, О. Е. Липатова, Т. Ю. Тельнова, М. М. Моргунова, С. С. Шашкина, Д. В. Аксёнов-Грибанов, 2024

Оптическая плотность водоросли *C. vulgaris* в контрольных условиях на 3-е сутки от начала культивации составила 0,367, на 6-е сутки — 0,805 и на 9-е сутки — 1,112. При добавлении 0,5 мл экстракта яиц муравьев в первые 3 суток от начала культивации оптическая плотность экспериментального образца составила 0,620, на 6-е сутки — 0,953 и на 9-е сутки — 1,188. В течение первых 6 суток от начала культивации наблюдали статистически значимые отличия по сравнению с контрольными условиями. При добавлении 1,5 мл экстракта на 3-е сутки оптическая плотность составила 0,717, на 6-е сутки — 0,985 и на 9-е сутки — 1,145. При этом статистически значимые отличия отмечали в течение всего эксперимента. Таким образом, было установлено, что добавление экстракта яиц муравьев стимулирует рост водоросли *C. vulgaris*.

При оценке антимикробной и антиоксидантной активности экстрактов, полученных из яиц муравьев, было выявлено, что экстракт обладает антибактериальной активностью в отношении бактерий *Pseudomonas putida* B-4589, *Kocuria rhizophila* B-5389, *Escherichia coli* B-6645, *Escherichia coli* tolC KanR. Также выражена антиоксидантная активность экстрактов.

Таким образом, показано, что экстракты, полученные из яиц муравьев, обладают биологической активностью в части ростостимуляции одноклеточных водорослей, а также антимикробной и антиоксидантной активностями.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-57

ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИКА С НОКАУТОМ ГЕНА CSN2 (B-CAS)*

PRODUCTION OF A RABBIT WITH A KNOCKOUT OF THE CSN2 GENE (B-CAS)

Д. Г. Воронина, Е. А. Патраханов, В. М. Покровский,
Д. Н. Сушкова, А. В. Дейкин, М. В. Корокин

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

D. G. Voronina, E. A. Patrakhanov, V. M. Pokrovsky,
D. N. Sushkova, A. V. Deykin, M. V. Korokin

Belgorod State National Research University

✉ diana0085@inbox.ru

Аннотация

Создание кролика с нокаутом гена CSN2 (β-cas) представляет собой важную задачу в области генетических технологий. Ее достижение позволит использовать таких животных в качестве фоновой линии для получения продуцентов человеческих терапевтических белков, что значительно повысит эффективность производства рекомбинантных препаратов. Основная цель исследования заключалась в нокаутировании указанного гена и расширении биомоделей ГМ — животных.

Abstract

The creation of a rabbit with a knockout of the CSN2 gene (β-cas) represents an important goal in the field of genetic technology. Its achievement will make it possible to use such animals as a background line for obtaining producers of human therapeutic proteins, which will significantly increase the efficiency of the production of recombinant drugs. The main goal of the study was to knock out this gene and expand biomodels of GM animals.

Изучение генетической модификации сельскохозяйственных животных ведется уже 36 лет [1]. За это время произошел значительный прогресс в технологиях генной инженерии, расширив спектр возможностей для модификации генома животных. Особое внимание в настоящее время уделяется методам генного редактирования, которые считаются одним из наиболее перспективных направлений современной биоинженерии.

Молоко — неотъемлемая часть рациона человека, однако его белковый состав может вызывать аллергические реакции. В частности, пептид β-казоморфин, являющийся продуктом ферментативного расщепления β-казеина в процессе переваривания молока в желудке, обладает иммуносупрессивными свойствами и может являться одним из факторов риска развития сахарного диабета 2-го типа [2].

β-казеины являются преобладающими белками молока в массовом соотношении к другим белкам и существуют в двух основных генетических вариантах: A1 и A2. Следует понимать, что A1-подобные типы β-казеина вызывают воспаление в кишечнике, а также являются возможной причиной усиления воспалительной реакции для расстройств различной этиологии [3]. Следовательно, снижение содержания β-казеина в молочных продуктах обусловлено потребностью получения гипоаллергенных молочных продуктов.

На сегодняшний день все чаще используются трансгенные и нокаутные животные в качестве биореакторов, т. е. продуцентов биологически активных терапевтических белков человека.

Цель исследования заключалась в нокаутировании гена кролика CSN2 (β-cas), а также в расширении биомоделей генно-модифицированных животных.

Материалы и методы

Животные. Эксперимент по созданию кролика с нокаутом гена CSN2 (β-cas) проводился на 251 кролике породы «Хиколь», массой тела 2900–3100 г.

Создание генетической конструкции. Создание нокаута гена кролика осуществлялось методом CRISPR/Cas. Ген CSN2 локализуется на 15-й хромосоме и имеет 9 экзонов. С помощью инструмента онлайн-поиска CHOPCHOP была отобрана sgRNA.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-1346). Разработка автоматизированной системы проводилась при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № FZWG-2021-0016).

© Д. Г. Воронина, Е. А. Патраханов, В. М. Покровский, Д. Н. Сушкова, А. В. Дейкин, М. В. Корокин, 2024

Микроинъекция эмбрионов. Микроинъекцию проводили через пневматический микроинъектор с помощью гидравлических микроманипуляторов под визуальным контролем через инвертированный исследовательский микроскоп. Микроинъекции производились в одно и то же время суток, одним оператором.

Трансплантация эмбрионов. После проведения микроинъекции эмбрионов оценивали их целостность и отделяли живые эмбрионы от погибших. Трансплантация эмбрионов осуществлялась самкам-реципиентам с визуализируемой копулятивной пробкой после ссаживания с вазэктомированным самцом. Эмбрионы помещались в воронку яйцевода как в правый, так и в левый рог [4].

Генетический анализ. Для проведения генетического анализа потомства с целью изучения изменения генома в гене интереса CSN2 полученных после проведения микроинъекции эмбрионов было произведено секвенирование по Сенгеру согласно протоколу. Анализ образцов проводился с помощью интернет-ресурса Syntego.

Результаты

В результате проведения серии экспериментов по созданию кролика с нокаутом в гене CSN2 методом CRISP/CAS 9 было подготовлено 200 самок доноров, получено 2110 эмбрионов, из которых 1987 эмбрионов характеризовали как нормальные и 123 — как абнормальные. После микроинъекций было получено 640 живых клеток, которые были пересажены 32 самкам-реципиентам. В ходе серии экспериментов было получено 19 особей от самок-реципиентов.

По результатам анализа потомства с помощью секвенирования Reverse последовательности было выделено четыре образца: 177, 178, 182, 183.

№ 177 является мозаиком. По результатам программы возможно 8 вариантов редактирования генома, из которых 6 вариантов делеция и 2 инсерции.

№ 178 является мозаиком с четырьмя вариантами нокаута гена в организме: в одном случае — инсерция одного нуклеотида после векторной последовательности, в остальных трех случаях — делеция на 38, 27, 35 нуклеотидов соответственно.

№ 182 имеет вставку одного нуклеотида, что может говорить о высокой вероятности сдвига рамки считывания.

№ 183 является мозаиком с шестью вариантами изменения генома в соматических клетках: в трех случаях — инсерция в размере 18, 17, 1 нуклеотид и в трех случаях — делеция в размере 28, 19, 2 в области гайдовой последовательности.

Таким образом, было получено четыре первичных мутанта с измененным генетическим кодом в области интересующего гена.

Литература

1. Максименко О. Г., Дейкин А. В., Ходарович Ю. М., Георгиев П. Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // Acta Naturae. 2013. № 1 (16). С. 33–46.

2. Pereira M. A., Jacobs D. R., van Horn L. et al. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study // JAMA. 2002. Vol. 287, No. 16. P. 2081–2089.

3. Ul Haq M. R., Kapila R., Sharma R., Saliganti V., Kapila S. Comparative evaluation of cow β-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut // Eur. J. Nutr. 2014. Vol. 53, No. 4. P. 1039–1049.

4. Patrakhanov E. A., Pokrovsky V. M., Karagodina A. Yu. et al. Development of Murine Stem Cells with Conditional Knockout of Humanized Snca Gene // Pharmacy Pharmacology. 2022. Vol. 10 (6). P. 525–535.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-58

ПРОТИВОГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *SOLANUM TUBEROSUM* L.

ANTI-HYPOXIC ACTIVITY OF POLYSACCHARIDE FROM *SOLANUM TUBEROSUM* L.

Е. А. Генералов[1], Д. П. Ларюшкин[2], К. А. Крицкая[2], Л. В. Генералова[3]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Институт биофизики клетки, Пущинский научный центр биологических исследований РАН*
[3] *Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва*

E. A. Generalov[1], D. P. Laryushkin[2], K. A. Kritskaya[2], L. V. Generalova[3]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Institute of Cell Biophysics, Pushchino Scientific Center for Biological Research RAS*
[3] *Peoples' Friendship University of Russia named after P. Lumumba, Moscow*

✉ generals1179@gmail.com

Аннотация

Полисахарид (STP) был выделен из водного экстракта *Solanum Tuberosum L.* и очищен с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Противогипоксическое действие полисахарида показали в модели нормобарической гипоксии на самках белых беспородных мышей.

Abstract

Polysaccharide (STP) was isolated from the aqueous extract of Solanum tuberosum L. and purified by ion exchange chromatography and gel filtration. The antihypoxic effect of the polysaccharide was demonstrated in a model of normobaric hypoxia in female outbred white mice.

Введение

Solanum Tuberosum L. относится к семейству пасленовых. Это всемирно известное культурное растение, дающее высокие урожаи ценных в питательном отношении продуктов питания в виде клубней. Сырой картофель, картофельный сок и ткани использовались в качестве лекарственного средства [1] для лечения желудочно-кишечных дисфункций и противовоспалительного средства [2]. Существуют хорошо известные способы экстракции клеточных стенок картофеля и исследования их состава и структуры содержащихся в них полисахаридов [3]. К сожалению, нет данных по растворимым полисахаридам картофельного сока. Кроме того, отсутствуют данные по влиянию компонентов картофеля на гипоксию, которая является важным патогенетическим фактором в развитии многих острых и хронических заболеваний [4]. При этом многие компоненты из растительных источников обладают противогипоксическим действием [5].

Материалы и методы

Полисахарид (STP) был выделен из водного экстракта *Solanum Tuberosum* L. и очищен с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации [6]. В опытах по изучению противогипоксического действия использовали самок белых беспородных мышей массой 29–34 г.

STP готовили в виде 0,9%-го раствора NaCl, который фильтровали через 0,22 мкм фильтр. В эксперименте 0,2 мл стерильного раствора STP вводили под кожу за 1 ч до начала эксперимента в изучаемых дозах: 0,1; 0,25; 1,0 мг/кг. Интактным животным (контроль) вводили физиологический раствор в том же объеме, другая группа контроля (положительный контроль) — с препаратом сравнения (настойка биоженьшеня).

Противогипоксическое действие препарата изучалось на мышах. Гипоксическую нормобарическую гипоксию вызывали, помещая животных в замкнутый сосуд с известной емкостью 1710 см^3 [7]. Наблюдение за состоянием животных проводили до момента их гибели. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0. Данные показателей периферической крови обрабатывали с использованием доверительных интервалов средних сравниваемых величин по стандартному методу Стьюдента, после проверки данных на нормальность с помощью критерия Шапиро — Уилка для малых выборок ($n < 50$), критерия Лиллиефорса с учетом параметров выборочного распределения и К-критерия Д'Агостино.

© Е. А. Генералов, Д. П. Ларюшкин, К. А. Крицкая, Л. В. Генералова, 2024

Результаты

Результаты эксперимента представлены в таблице. В условиях эксперимента нормобарической гипоксии STP во всех дозах статистически значимо увеличивал продолжительность жизни подопытных животных. Можно отметить дозозависимость биологической активности STP.

Влияние препарата STP на продолжительность жизни мышей в условиях нормобарической гипоксии

Группа	Доза, мг/кг	Вес мышей, г	Среднее время жизни мышей, мин		
			M ± m	t	P
STP	0,1	29,9 ± 2,7	31,0 ± 3,2	2,76	0,02
STP	0,25	33,8 ± 2,6	35,6 ± 2,4	2,29	0,05
STP	1,0	34,1 ± 1,6	43,4 ± 6,8	2,74	0,02
Контроль (интактн.)	–	33,9 ± 1,9	25,5 ± 1,9	–	–
Настойка биоженьшеня	0,2 мл/20г	32,3 ± 0,8	33,7 ± 1,1	2,36	0,05

Выводы

Полисахарид STP обладает противогипоксическими свойствами в модели нормобарической гипоксии, что может быть использовано в будущем для создания противогипоксических средств.

Литература

1. Vlachojannis J. E., Cameron M., Chrubasik S. Medicinal use of potato-derived products: a systematic review // Phytother Res. 2010. Vol. 24. P. 159–62.

2. Tiarasanti F., Sufiawati I., Amalia E. et al. The Effects of Potato (Solanum tuberosum L. vs. Granola; Solanaceae) Peel Extract Gel on Gingival Wound Healing in Wistar Rats // J. Exp. Pharmacol. 2024. Vol. 16. P. 25–35.

3. Vaitkevičienė N., Kulaitienė J., Jarienė E. et al. Characterization of Bioactive Compounds in Colored Potato (Solanum Tuberosum L.) // Cultivars Grown Conventional, Organic, Biodynamic Methods. Sustainability. 2020. Vol. 12. P. 2701.

4. Chen P. S., Chiu W. T., Hsu P. L. et al. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases // J. Biomed. Sci. 2020. Vol. 27. P. 63.

5. Симонова Н. В. Лекарственные растения Приамурья: учеб. пособие // Амур. Гос. мед. акад. Благовещенск: Амурская ГМА, 2022. 487 с.

6. Генералов Е. А., Яковенко Л. В. Состав и митогенная активность полисахарида из Solanum tuberosum L. 2023 // Биофизика. Т. 68 (5). С. 856–862.

7. Караев А. Я., Ковлер М. А., Авакумов В. М. Противогипоксическое действие карнитина хлорида // Фармакология и токсикология. 1991. Т. 54, № 5. С. 42–44.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-59

РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРЕПТОМИЦИНА В МОЛОКЕ

DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF STREPTOMYCIN IN MILK

А. Г. Гербст[1,2], А. А. Моисеева[2], А. А. Семейкина[2]

[1]*Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва*
[2]*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва*

A. G. Gerbst[1,2], A. A. Moiseeva[2], A. A. Semeykina[2]

[1]*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow*
[2]*Bakh Institute of Biochemistry RAS, Moscow*

✉ Gerbst-Alexander@yandex.ru

Аннотация

В работе представлена разработка тест-системы для обнаружения стрептомицина в молоке, включая основные этапы и используемые компоненты. Рассмотрены методы связывания гаптена с белком, подбор оптимальных буферных сред для нанесения реагентов и проведения анализа, а также состав мультимембранного композита. Эти исследования позволили создать высокочувствительный и надежный тест для мониторинга качества молочной продукции.

Abstract

This paper presents the development of a test system for the detection of streptomycin in milk, including the main stages and components used. The methods of hapten binding to protein, the selection of optimal buffer solutions for reagent application and analysis, and the composition of the multi-membrane composite are considered. These studies have allowed the creation of a highly sensitive and reliable test for monitoring the quality of dairy products.

Стрептомицин — это антибиотик широкого спектра действия, который часто используется в ветеринарии для лечения различных инфекций животных, вызванных бактериями. Одним из важных аспектов использования стрептомицина в ветеринарии является его потенциальное попадание в молоко при лечении крупного рогатого скота. Это происходит вследствие пассивной диффузии антибиотика через эпителий молочной железы. Употребление молока с высоким содержанием стрептомицина людьми может привести к развитию устойчивых к антибиотикам бактерий, что представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Развитие резистентности к антибиотикам — глобальная угроза, так как устойчивые патогены трудно поддаются лечению и могут вызывать серьезные и потенциально опасные для жизни инфекции.

Среди множества методов определения содержания антибиотиков в молоке, представленных на рынке, иммунохроматографический анализ выделяется как наиболее перспективный. Иммунохроматографический метод анализа основан на принципах специфического взаимодействия антител с антигенами и используется для качественного или количественного определения различных веществ, таких как антибиотики. Поэтому целью исследования является разработка иммунохроматографической тест-системы для выявления стрептомицина в молоке.

Для реализации исследования в качестве маркера использованы частицы цветных латексов, которые были конъюгированы с моноклональными антителами против стрептомицина карбодиимидно-сукцинимидным методом.

Конъюгат гаптена с белком синтезирован из стрептомицин-сульфата с использованием таких химических реагентов, как цианурхлорид и триэтиламин в качестве катализатора. В качестве белка использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). При синтезе гаптен-белка проведен подбор концентрации активного вещества стрептомицина (от 17 до 68 мг/мл) и концентрации белка (от 5 до 20 мг/мл) для достижения наиболее стабильного связывания с БСА и низкого предела детекции. По результатам экспериментальных данных подобраны оптимальные концентрации для синтеза, а именно: стрептомицин-сульфат — 68 мг/мл, БСА — 20 мг/мл.

Проведена оптимизация условий для нанесения реагентов на рабочую мембрану. Исследовались три типа буферных растворов: на основе триса, бората и фосфатных солей. Определялась оптимальная молярность (от 10

© А. Г. Гербст, А. А. Моисеева, А. А. Семейкина, 2024

до 50 мМ) и концентрации добавок в виде сахаров, таких как сахароза, мальтоза и трегалоза (от 1 до 4 %). Наилучшие результаты работы реагентов достигнуты при использовании буферного раствора на основе бората (10 мМ) с добавлением 4 % трегалозы.

В ходе разработки иммунохроматографической тест-системы проведена оптимизация состава мультимембранного композита. Осуществлена сравнительная оценка рабочих мембран (Sartorius, Германия), а также мембран для образца и конъюгата (KinBio, Китай). Применение микростекловолоконной мембраны для образца ВТ-03 и стекловолоконной мембраны для конъюгата СВ-06 от компании KinBio обеспечило более высокую чувствительность и интенсивность окрашивания по сравнению с другими типами мембран. В качестве рабочей мембраны выбрана CN-95 (Sartorius), которая обладает подходящим размером пор и обеспечивает равномерное прохождение образца молока с комплексом биореагентов к тестовой и контрольной зонам.

В процессе экспериментов подобрана реакционная среда для достижения минимального предела обнаружения. Оценены три типа буферных растворов: на основе трис-соединения, а также солей бората и фосфата. Исследованы диапазоны pH (от 6 до 9) и молярности (от 50 до 200 мМ) для каждой из выбранных буферных основ. Наилучшие характеристики тест-системы достигнуты при использовании трис буфера с молярностью 100 мМ и pH 8,5.

Предел обнаружения разработанной иммунохроматографической тест-системы для определения антибиотика стрептомицина в молоке при визуальном анализе составляет 200 нг/мл. Время проведения анализа — 10 мин. Полученные результаты соответствуют требованиям российского законодательства (СанПиН 2.3.2.1078-01), что подтверждает пригодность тест-системы для контроля содержания стрептомицина в молоке.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-60

ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОРГАНОГЛИН И ИХ КОМПЛЕКСОВ С PB(II) НА АВТОХТОННЫЕ ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ *

ASSESSMENT OF THE TOXIC EFFECTS OF ORGANOCLAYS AND THEIR COMPLEXES WITH PB (II) ON AUTOTROPHIC SOIL MICROORGANISMS

М. М. Герцен, Л. В. Переломов

Тульский государственный педагогический университет им. Л. Н. Толстого

M. M. Gertsen, L. V. Perelomov

Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University

✉ mani.gertsen@gmail.com

Аннотация

В работе изучали токсическое действие органоглин и их комплексов с катионом свинца на сообщество автохтонных почвенных бактерий серой лесной почвы: установлено, что при 1 % содержании минимальной токсичностью, независимо от способа внесения объекта, обладают органоглины на основе алкилполиглюкозида (амфотерный ПАВ) и кокоамфодиацетата динатрия (неионогенный ПАВ).

Abstract

The toxic effect of organoclays and their complexes with lead cations on the community of autochthonous soil bacteria in grey forest soil was studied. It was found that, at 1 % concentration, organoclay based on alkyl polyglucosides (amphoteric surfactants) and disodium cocamphodiacetates (nonionic surfactant), have minimal toxicity regardless of the method of introduction.

В настоящее время актуальным представляется поиск и разработка технологий очистки экосистем от тяжелых металлов, являющихся одними из самых распространенных поллютантов как водных, так и почвенных экосистем [1]. Высокоэффективными и экологически чистыми являются адсорбционные технологии с применением сорбентов. Среди них наиболее перспективны глинистые минералы — группа водных силикатов, представляющих основную массу глинистых отложений и большей части почв и определяющих их физико-химические, механические и другие свойства. Благодаря этим свойствам они применяются во многих отраслях промышленности, среди которых очень важно их использование в качестве экологически чистых сорбентов. Различные модификации глин, в частности органическими веществами, могут кратно повысить их сорбционные свойства. В настоящее время ведутся активные исследования состава и свойств органоглин, их сорбционной способности, прочности связывания поллютантов, улучшения методик синтеза, подбора наилучших модификаторов и способов их применения [2]. Цель работы — оценка токсического воздействия исходных глин и органоминеральных комплексов на основе бентонита и поверхностно-активных веществ разных типов (амфотерных, неионогенных) и их комплексов с катионом свинца на почвенные микроорганизмы.

Объекты исследования — бентонит Саригюхского месторождения (Армения, компания BentoGroupMinerals) и органоглины, полученные путем интеркалирования неионогенных и амфотерных ПАВ (кокоамфодиацетат динатрия (5), кокоиминодипропионат натрия (1), лаураминоксид (2), кокамид диэтаноламин (3), алкилполиглюкозид (7)). Для оценки токсичности органоглин в качестве тест-объекта использовали сообщество автохтонных почвенных бактерий (серая лесная почва).

В зависимости от вида ПАВ, с помощью которого производилась модификация глинистых минералов, полученные органоглины оказывали различное влияние на рост и разнообразие микроорганизмов. При этом в случае применения внешнего способа внесения объектов в виде вытяжки явного токсического действия не наблюдалось (рис. 1).

При добавлении исходного бентонита визуальные изменения в состоянии роста бактерий не происходили в сравнении с контролем. В случае органоглин, модифицированных как неионогенными, так и амфотерными

* Исследование выполнено в рамках государственного задания по теме «Иммобилизация тяжелых металлов продуктами взаимодействий слоистых силикатов с почвенным органическим веществом и микроорганизмами» (соглашение на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) № 073-00033-24-01 от 9.02.2024, заключенным с Минпросвещения России).

© М. М. Герцен, Л. В. Переломов, 2024

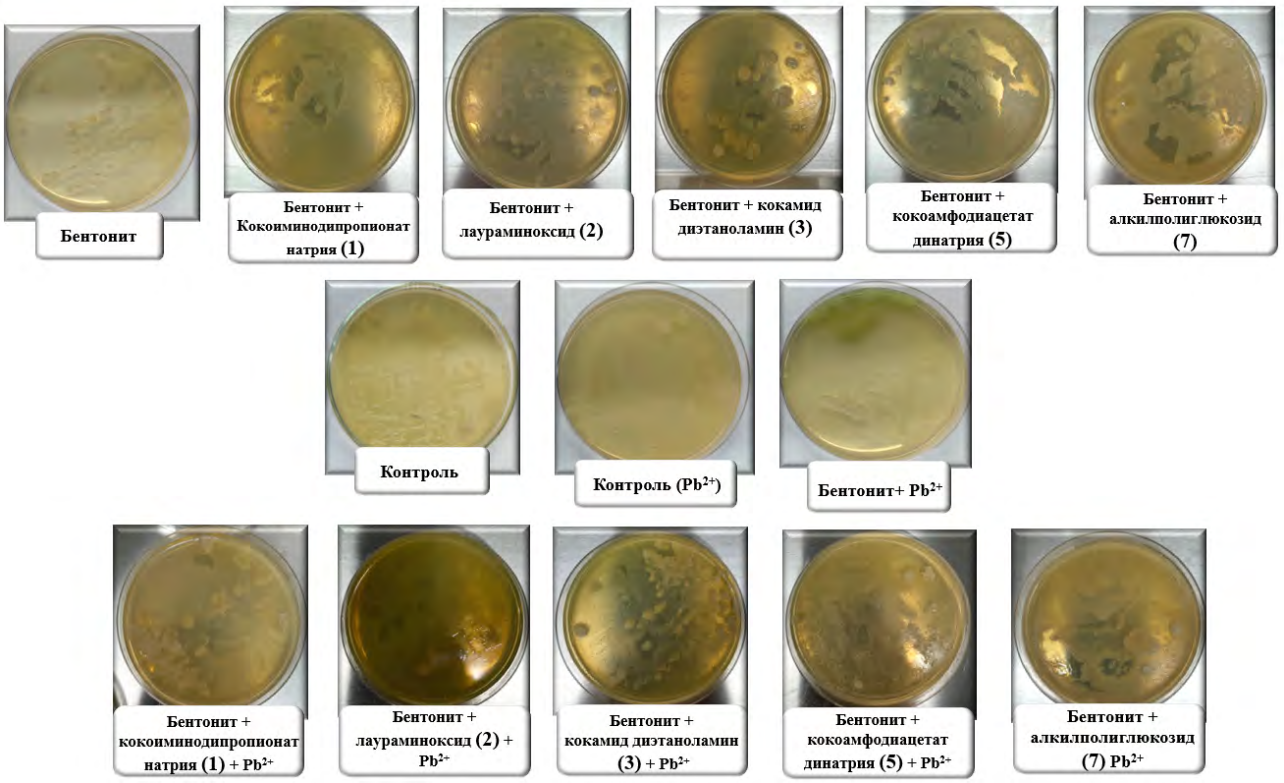


Рис. 1. Влияние органоглин и их комплексов с катионом Pb (II) на колонии автохтонных почвенных бактерий (внешний способ нанесения)

ПАВ в концентрации 1 %, наблюдался рост преимущественно актиномицетов и дрожжевых грибов. Вероятно, это связано с тем, что именно данные организмы имеют более широкий спектр адаптационных механизмов, которые обеспечивают их устойчивость к воздействию различных агентов, в том числе ПАВ. Оценка колониеобразующих единиц при внесении органоглин и их комплексов с катионом свинца непосредственно в питательную среду (1 %) представлена на рис. 2.

Установлено, что при внесении органоглин в питательную среду происходит значительное снижение КОЕ/г: на 40 ± 4 — 84 ± 2 % в зависимости от используемого ПАВ. Минимальной токсичностью обладают органоми-

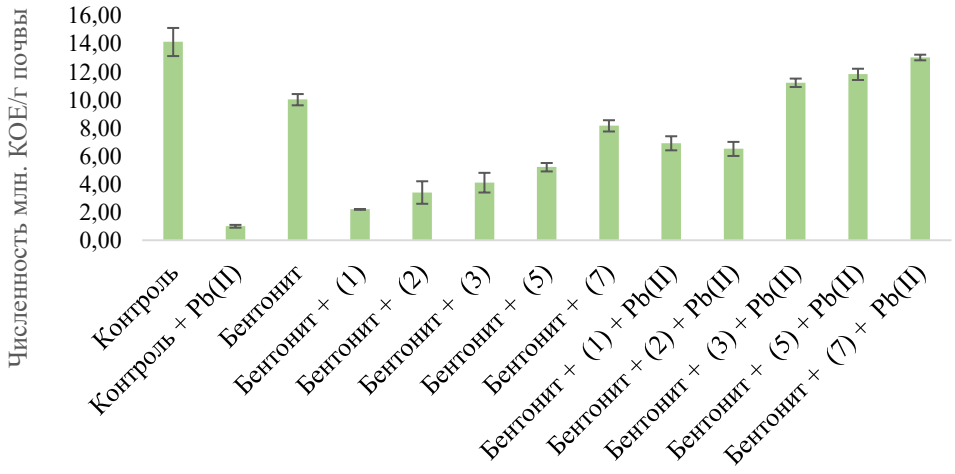


Рис. 2. Численность КОЕ/г почвы при внесении органоглин и их комплексов с катионом Pb (II): *1* — кокоиминодипропионат натрия, *2* — лаураминоксид, *3* — кокамид диэтаноламин, *5* — кокоамфодиацетат динатрия, *7* — алкилполиглюкозид

неральные комплексы на основе кокоамфодиацетата динатрия и алкилполиглюкозида. При исследовании числа КОЕ/г при использовании комплексов с катионом свинца токсичность практически не наблюдается: число КОЕ/г сопоставимо с контролем. Влияние синтезированных органоглин и их комплексов с катионом свинца на токсичность почвенного сообщества может быть связана с одновременной сорбцией ПАВ исходными минералами и дальнейшим поглощением Pb^{2+}, что объясняется наличием разнообразных функциональных групп, доступных для связывания металла и амфотерным ПАВ (кокоамфодиацетат динатрия), и неионогенным (алкилполиглюкозид) [3].

Литература

1. Zhao H., Wu Y., Lan X. et al. Comprehensive assessment of harmful heavy metals in contaminated soil in order to score pollution level // Sci. Rep. 2022. Vol. 12 (1). P. 3552.

2. Cruz-Guzmán M., Celis R., Hermosin M. C. et al. Heavy metal adsorption by montmorillonites modified with natural organic cations // Soil Sci. Soc. Am. J. 2006. Vol. 70 (1). P. 215–221.

3. Perelomov L., Gertsen M., Burachevskaya M. et al. Organoclays Based on Bentonite and Various Types of Surfactants as Heavy Metal Remediants // Sustainability. 2024. Vol. 16 (11). P. 4804.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-61

СКРИНИНГ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПО СПЕКТРУ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ

SCREENING OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA BY THE SPECTRUM OF HYDROCARBONS USED

Д. М. Голубев[1], А. С. Коробейникова[1], В. Н. Нечаев[2], О. В. Нечаева[2], Е. В. Глинская[1]

[1] *Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского*
[2] *Саратовский государственный технический университет им. Ю. А. Гагарина*

D. M. Golubev[1], A. S. Korobeynikova[1], V. N. Nechaev[2], O. V. Nechaeva[2], E. V. Glinskaya[1]

[1] *Saratov State University*
[2] *Gagarin Saratov State Techical University*

✉ dimagolubev2018@yandex.ru

Аннотация

Одной из ключевых экологических проблем является нефтяное загрязнение. Для восстановления контаминированных территорий применяют биопрепараты на основе бактерий-нефтедеструкторов. В работе проведен скрининг штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из антропогенно нарушенных почв. Штаммы *A. lwoffii*, *B. circulans*, *B. horikoshii*, *O. gallinifaecis* и *P. polymyxa* обладали наиболее широким субстратным спектром.

Abstract

One of the key environmental problems is oil pollution. Biologics based on oil-destructing bacteria are used to restore contaminated areas. In the work, screening of strains of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from anthropogenic disturbed soils was carried out. The strains *A. lwoffii*, *B. circulans*, *B. horikoshii*, *O. gallinifaecis* and *P. polymyxa* had the widest substrate spectrum.

Добыча, транспортировка, хранение и переработка нефти сопровождаются различными потерями. Загрязнение почвы нефтяными углеводородами оказывает сильное негативное воздействие на окружающую среду [1]. Снижается водопроницаемость почвы, нарушаются естественные геохимические циклы, экосистемы становятся непригодными для живых организмов [2].

Известны традиционные физические, химические и механические методы восстановления загрязненных территорий, однако каждый из них имеет свои недостатки [3]. Биоремедиация представляет собой альтернативный подход для очистки окружающей среды с применением живых организмов. Этот подход является более экономичным, эффективным и экологически безопасным по сравнению с физико-химическими и механическими методами [4]. В частности, перспектива рекультивации нарушенных почв с использованием углеводородокисляющих бактерий имеет широкий потенциал [5].

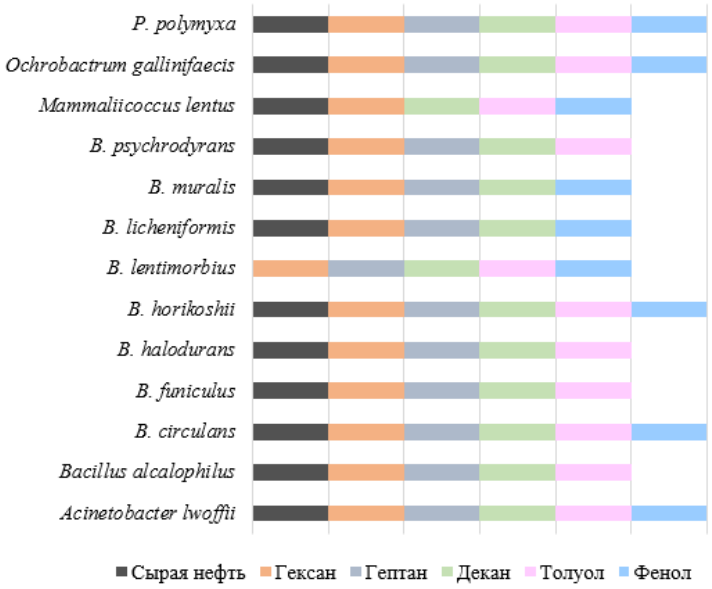
Целью исследования являлся скрининг штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из антропогенно нарушенных почв, по спектру окисляемых углеводородов.

В работе использовали штаммы бактерий, выделенные из антропогенно нарушенных почв г. Когалыма (Ханты-Мансийский автономный округ), главного нефтегазоносного района России (*Bacillus alcalophilus, B. funiculus, B. halodurans, B. psychrodurans*), из почв земельных участков сельскохозяйственного назначения с хроническим нефтяным загрязнением на северо-западе от с. Новокривовка (Саратовская область), на территории которых был установлен факт пролива нефтепродуктов в результате порыва нефтепровода (*B. licheniformis, B. muralis, Paenibacillus polymyxa*), а также из урбаноземов, индустриоземов, культуроземов и природных почв г. Балаково (Саратовская область), промышленного центра Саратовской области (*Acinetobacter lwoffii, B. circulans, B. horikoshii, B. lentimorbius, Mammaliicoccus lentus, Ochrobactrum gallinifaecis*) [6–8].

Для изучения субстратного спектра углеводородокисляющих бактерий использовали следующие субстраты: предельные углеводороды — гексан, гептан, декан; ароматические углеводороды — толуол, фенол, а также сырую нефть. Способность бактерий к окислению исследуемых субстратов определяли с помощью метода лунок [9].

Штаммами, способными окислять все использованные углеводороды, оказались *A. lwoffii, B. circulans, B. horikoshii, O. gallinifaecis* и *P. Polymyxa* (см. рисунок).

© Д. М. Голубев, А. С. Коробейникова, В. Н. Нечаев, О. В. Нечаева, Е. В. Глинская, 2024



Спектр углеводородов, используемых углеводородокисляющими микроорганизмами

Гексан и декан подвергали окислению все исследованные штаммы углеводородокисляющих бактерий. Сырую нефть не был способен окислять *B. lentimorbius*, гептан — *M. lentus*, толуол — *B. muralis* и *B. licheniformis*, фенол — *B. psychrodyrans, B. halodurans, B. funiculus* и *B. alcalophylus*.

Результаты исследования будут полезны при создании комплексного подхода для проведения реабилитационных мероприятий техногенно преобразованных почв. Штаммы бактерий, способные разлагать наибольшее количество субстратов, являются перспективными агентами для биоремедиации.

Литература

1. Doszhanov Y. et al. Bioremediation of Oil-Contaminated Soils of the Zhanazhol Deposit from West Kazakhstan by Pseudomonas mendocina H-3 // Appl. Environ. Soil Sci. 2024. Vol. 2024, No. 1. P. 8510911.

2. da Silva Correa H. et al. Effects of oil contamination on plant growth and development: a review // Environ. Sci. Pollut. Res. 2022. Vol. 29. P. 43501–43515.

3. Tripathi V. et al. Unlocking bioremediation potential for site restoration: A comprehensive approach for crude oil degradation in agricultural soil and phytotoxicity assessment // J. Environ. Manageme. 2024. Vol. 355. P. 120508.

4. Olalekan S. H., Nwakaego O. V. Investigating the Genetic Basis of Bioremediation Activity of Corynebacterium and Bacillus Species // SAU J. Sci. Technol. 2018. Vol. 3, No. 1. P. 28–39.

5. Mekonnen B. A., Aragaw T. A., Genet M. B. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: a review on principles, degradation mechanisms, and advancements // Frontiers Environ. Sci. 2024. Vol. 12. P. 1354422.

6. Плешакова Е. В., Глинская Е. В., Коробейникова А. С. и др. Микробиологическая оценка состояния городских почв нефтегазоносного региона (на примере территории Когалыма) // Поволж. эколог. журн. 2023. № 3. С. 352–373.

7. Нестеркина Д. Д., Голубев Д. М., Глинская Е. В., Нечаева О. В. Оценка количественных показателей физиологических групп микроорганизмов, выделенных из почв с хроническим нефтяным загрязнением // Исследования молодых ученых в биологии и экологии — 2023 : сб. науч. ст. IV Междунар. науч. конф. молодых ученых, Саратов, 17–20 апреля 2023 г. Саратов: Амирит, 2023. С. 83–84.

8. Овечкина А. А., Голубев Д. М., Нестеркина Д. Д., Глинская Е. В. Оценка количественных показателей физиологических групп микроорганизмов почв г. Балаково, участвующих в процессах круговорота азота // Исследования молодых ученых в биологии и экологии — 2024: сб. науч. ст. V Междунар. науч. конф. молодых ученых, Саратов, 15–17 апреля 2024 г. Саратов: Амирит, 2024. С. 151–152.

9. Коробейникова А. С., Глинская Е. В., Плешакова Е. В. Субстратный спектр углеводородокисляющих микроорганизмов почв г. Когалыма // Исследования молодых ученых в биологии и экологии — 2023: сб. науч. ст. IV Междунар. науч. конф. молодых ученых, Саратов, 17–20 апреля 2023 г. Саратов: Амирит, 2023. С. 58–59.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-62

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБОВ УВЕЛИЧЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ СИГНАЛА ОСНОВНЫХ ТИПОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ *

INVESTIGATION OF WAYS TO INCREASE THE SIGNAL INTENSITY OF THE MAIN TYPES OF CONTROL POINTS IN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEMS BASED ON NUCLEIC ACIDS

Е. А. Горбунова, А. В. Епанчинцева

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. A. Gorbunova, A. V. Epanchintseva

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ gorbunova-ekaterina@inbox.ru

Аннотация

Рассмотрены основные типы описанных в литературе контрольных точек в проточных тест-системах на основе нуклеиновых кислот: на контрольной точке иммобилизованы стрептавидин (1), ДНК с гетеро- (2) и гомопоследовательностями (3). Показано, что помимо Уотсон — Криковских взаимодействий, а также взаимодействий биотин — стрептавидин реализуются иные типы взаимодействий, которые вносят высокий негативный вклад в специфичность тестирования.

Abstract

The main types of control points described in the literature in flow test systems based on nucleic acids are considered: streptavidin (1), DNA with hetero- (2) and homo-sequences (3) are immobilised on the control point. It was shown that in addition to Watson-Crick interactions and biotin — streptavidin interactions, other types of interactions are realised, which make a high negative contribution to test specificity.

Типичная иммунохроматографическая тест-система состоит из трех основных частей: подложка для образца, детектирующая мембрана и адсорбирующая подложка. Мы проверили разные материалы для каждой из перечисленных частей тест-полоски.

Наилучшие результаты продемонстрировали: целлюлозное волокно толщиной 0,825 мм в качестве адсорбирующей подложки, нитроцеллюлозные мембраны (НЦМ) с размерами пор 5 и 8 мкм и подложка для образца из стекловолокна.

Тестирование выполняется путем нанесения анализируемого раствора на подложку для образца, раствор движется под действием капиллярных сил через поры мембраны, далее в течение 10–20 мин определяется положительный или отрицательный результат теста с соответствующим визуально детектируемым проявлением тестовой полосы (точки) и контрольной полосы (точки; проявляется как в присутствии, так и в отсутствие целевой мишени). Для визуализации полос чаще всего используются наночастицы золота (НЧЗ) благодаря их химической инертности, высокому молярному коэффициенту поглощения, обеспечивающему окрашивание полосы в красный цвет, а также возможностью модификации их поверхности, в частности ДНК-зондами.

Целью работы было исследование способов увеличения интенсивности сигнала основных типов контрольных точек в тест-системах на основе нуклеиновых кислот. Для этого были сконструированы три варианта ДНК-зондов обнаружения: биотинилированный ДНК-зонд, ДНК-зонд с гетеропоследовательностью, ДНК-зонд с гомопоследовательностью. Зонды адсорбировались на НЧЗ за счет флуоресцеина (FAM), который, как было показано ранее, служит якорем адсорбции на НЧЗ [1].

В первом типе тест-полосок на контрольную полосу был иммобилизован стрептавидин. Конъюгат НЧЗ с олигонуклеотидом 5’-FAM-T_{20}-биотин-3’ формирует яркую красную контрольную точку на НЦМ, однако интенсивность контрольной точки определяется не только образованием комплекса биотин — стрептавидин, но и взаимодействием непокрытых участков поверхности НЧЗ в составе данного конъюгата со стрептавидином. Инкубация конъюгата НЧЗ- FAM-T_{20}-биотин в растворе бычьего сывороточного альбумина позволяет снизить неспецифические взаимодействия.

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 23-24-00505).

© Е. А. Горбунова, А. В. Епанчинцева, 2024

В следующем типе тест-полосок, с ДНК-зондом захвата на контрольной точке, окрашивание контрольной точки осуществляется за счет взаимодействия комплементарных нуклеиновых кислот на НЧЗ и НЦМ. В качестве промывочного раствора используется цитратно-солевой буфер, содержащий $Na_3C_6H_5O_7$ и NaCl. Показано, что поверхность НЧЗ неспецифически взаимодействует со стрептавидином на НЦМ, при этом в присутствии поверхностно-активных веществ на НЦМ эти взаимодействия усиливаются.

Основной причиной неэффективного взаимодействия комплементарных ДНК-зондов на НЧЗ и НЦМ с низкой интенсивностью окрашивания контрольной точки, вероятно, является электростатическое отталкивание. Однако если промывочный раствор, помимо $Na_3C_6H_5O_7$ и NaCl, содержит $MgCl_2$, то наблюдается значительное усиление интенсивности окрашивания контрольной точки, по-видимому, из-за более эффективного формирования ДНК дуплекса на ней.

В случае взаимодействия гомопоследовательностей T_{26} на НЧЗ и 5'-A_{26}-биотин-3' на НЦМ была показана высокая специфичность анализа при использовании цитратно-солевого буфера. Вероятно, это связано с возможностью реализации бóльшего числа двуцепочечных состояний на контрольной линии, а также с низкой вероятностью формирования стабильных вторичных структур у A_{26} и T_{26}. В то же время при добавлении в промывочный раствор $MgCl_2$ интенсивность окрашивания контрольной точки снижается.

Литература

1. Epanchintseva A. V., Gorbunova E. A., Ryabchikova et al. Effect of Fluorescent Labels on DNA Affinity for Gold Nanoparticles // Nanomaterials. 2021. Vol. 11 (5). P. 1178.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-63

РАЗРАБОТКА БИОГЕННОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ И РЕАЛИЗАЦИИ ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ РУССКОГО ОСЕТРА

DEVELOPMENT OF A NEW GENERATION BIOGENIC FEED ADDITIVE FOR THE PRESERVATION OF HEALTH AND REALIZATION OF PRODUCTIVE QUALITIES OF RUSSIAN STURGEON

В. А. Дворецкая[1], В. Г. Семенов[1], А. А. Юлдашев[2]

[1] Чувашский государственный аграрный университет, Чебоксары
[2] Филиал «Астраханский государственный технический университет» в Ташкентской области Республики Узбекистан, г.п. Салар

V. A. Dvoretskaya[1], V. G. Semenov[1], A. A. Yuldashev[2]

[1] Chuvash State Agrarian University, Cheboksary
[2] The branch of the Astrakhan State Technical University in the Tashkent region of the Republic of Uzbekistan, Salar

✉ babyceffy@list.ru

Аннотация

Разведение русских осетров становится все более популярным направлением аквакультуры России. Этот аквабионт ценится за деликатесную черную икру и превосходное качество мяса, однако длительный цикл развития, требовательность к условиям содержания и биологические особенности этого представителя рыб делают его разведение и выращивание дорогостоящим. Важнейшая цель осетроводства — получить качественную продукцию в краткие сроки с минимальными экономическими затратами. Для достижения данного результата была разработана биогенная кормовая добавка, воздействие которой рассматривается в этой работе.

Abstract

Breeding of Russian sturgeons is becoming an increasingly popular area of aquaculture in Russia. This aquatic animal is appreciated for its delicious black caviar and excellent meat quality, however, the long development cycle, demanding conditions and biological characteristics of this representative of fish make its breeding and cultivation expensive. The most important goal of sturgeon farming is to obtain high–quality products in a short time with minimal economic costs. To achieve this result, a biogenic feed additive has been developed, the effects of which are considered in this work.

Русские осетры (*Acipenser gueldenstaedtii*) с каждым годом чаще появляются в рыбоводческих хозяйствах разного уровня. Интерес к гидробионтам этого биологического вида обусловлен превосходным качеством мяса и ценностью икры.

В защите организма от возбудителей болезней и адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды решающую роль играет неспецифическая резистентность [1, 2]. Перспективный вектор развития ветеринарии — разработка и применение иммунотропных биологически активных препаратов [3, 4]. В связи с этим нами была разработана биогенная кормовая добавка Akwa-Biot-Norm, не имеющая аналогов.

Цель настоящей научно-исследовательской работы — определить эффективность биогенной иммунотропной кормовой добавки Akwa-Biot-Norm для повышения неспецифической резистентности и реализации продуктивных качеств русского осетра.

Akwa-Biot-Norm представляет собой суспензию из 50 массовых частей 1%-го раствора желатины, 1 массовой части концентрата очищенного полисахаридного комплекса *Saccharomyces cerevisiae* и 3 массовых частей левамизола [5]. За счет плохой растворимости желатины и быстрой поедаемости практически исключается потеря препарата в результате вымывания в воде [6].

Для опыта 2 группы русских осетров численностью по 50 голов были отделены в садки. Аквабионты опытной группы дополнительно в составе комбикормов получали биогенную кормовую добавку Akwa-Biot-Norm, из расчета 25 мл на 1 кг комбикорма, двумя курсами длительностью по 5 суток с перерывом 2 суток. Наблюдение проводилось в течение 3 недель.

Перед опытом и по его завершении (в конце 3-й недели) произвели отбор крови по 20 проб с каждой группы для биохимических и иммунологических исследований. В конце исследований оценили химический состав мышц рыб обеих групп.

© В. А. Дворецкая, В. Г. Семенов, А. А. Юлдашев, 2024

Результаты и их обсуждение. Показатели крови наиболее объективно демонстрируют физиологическое состояние организма аквабионта. Результаты исследования крови осетров на фоне применения биогенной кормовой добавки приведены в табл. 1.

Таблица 1

Иммунологические и биохимические показатели крови

Показатель и период	Группа особей	
	Опытная	Контрольная
	Бактерицидная активность сыворотки крови, %	
В начале опыта	14,74 ± 0,12	
В конце опыта	18,58 ± 1,11**	14,8 ± 0,09
	Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	
В начале опыта	18,74 ± 0,12	
В конце опыта	23,98 ± 0,26***	17,46 ± 0,2
	Лизоцим, мкг/л	
В начале опыта	9,24 ± 0,22	
В конце опыта	22,30 ± 4,02*	9,10 ± 0,12
	Общий белок, г/л	
В начале опыта	18,2 ± 0,28	
В конце опыта	20,3 ± 0,12	18,0 ± 0,05

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Отмечено на фоне применения кормовой добавки Akwa-Biot-Norm изменение уровня бактерицидной активности сыворотки с 14,74 до 18,66 %. Фагоцитарная активность в ходе исследования достоверно выросла на 5,24 %. Концентрация лизоцима в сыворотке крови русского осетра в обеих группах находилась в пределах физиологических норм, но значение его в опытной группе было достоверно выше контрольного и первоначального. Отмечается также повышение общего белка на 11,5 %. Это свидетельствует об активизации синтетических процессов в организме рыб.

Для оценки влияния биогенной кормовой добавки на обменные процессы у русского осетра был также изучен химический состав мышц. В начале опыта рыбы обеих групп имели аналогичные показатели. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Таблица 2

Химический состав мяса русского осетра

Группа	Влага, %	Сухое вещество, %	Состав сухого вещества, %		
			Сырой протеин	Сырой жир	Зола
Контрольная	68,73 ± 0,09	31,27 ± 0,09	23,37 ± 0,04	7,22 ± 0,08	0,68 ± 0,09
Опытная	63,82 ± 0,06*	36,18 ± 0,03***	26,62 ± 0,04***	8,15 ± 0,12***	1,41 ± 0,11**

* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Полученные показатели свидетельствуют о том, что у рыб опытной группы содержание влаги в мышцах составляло в среднем 63,82 %, что на 4,91 % ниже, чем в контрольной группе. Кроме того, после применения биогенной кормовой добавки Akwa-Biot-Norm русский осетр в составе опытной группы имел на 4,91 % сухого вещества в мясе больше, чем аналог из контрольной. Массовая доля протеина, жира и золы у рыб опытной группы стала выше контроля на 3,25; 0,93 и 0,73 %. Это указывает на повышение обменных процессов в организме осетровых рыб при применении исследуемого препарата. Все изученные показатели находятся в пределах нормы.

Резюмируя вышеизложенное, следует заключить, что после применения добавки Akwa-Biot-Norm в составе комбикормов наблюдается увеличение интенсивности обмена веществ организма русского осетра, что приводит к повышению неспецифической резистентности, а также к улучшению качества мяса гидробионтов.

Литература

1. Буяров В. С., Юшкова Ю. А. Эффективность применения биологически активных добавок в рыбоводстве // Вестн. Орлов. гос. аграр. Ун-та. Орел, 2016. № 3 (60). С. 30–39.

2. Жатканбаева Д. М., Жатканбаева Д. М., Койшибаева С. Л. и др. Испытание в аквакультуре биологически активных веществ, повышающих иммунное состояние рыб // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. М., 2013. № 4. С. 151–154.

3. Никитина А. П., Семенов В. Г., Косяев Н. И. Испытание в аквакультуре биологически активного препарата, повышающего иммунологический статус // Молодежь и инновации: материалы XII Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов, посвящ. 85-летию Чуваш. гос. с.-х. акад. Чебоксары: Чуваш. гос. с.-х. акад., 2016. С. 157–161.

4. Пономарев С. В., Федоровых Ю. В., Ушакова Н. А. и др. Инновационные решения для повышения эффективности аквакультуры // Материалы Всерос. науч.-практ. конф. М., 2019. С. 305–309.

5. Семенов В. Г., Мударисов Р. М., Никитин Д. А. Биогенная кормовая добавка Akwa-Biot-Norm в реализации биопотенциала осетровых рыб // Аграрная наука в инновационном развитии АПК: материалы Междунар. науч.-практ. конф. в рамках XXVI Междунар. специализ. выставки «Агрокомплекс-2016». Уфа: Башкирский ГАУ, 2016. Ч. II. С. 199–206.

6. Семенов В. Г., Мударисов Р. М., Никитин Д. А. К проблеме реализации биопотенциала осетровых рыб // Вестн. Башкир. гос. аграр. ун-та. Уфа, 2016. № 4 (40). С. 68–73.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-64

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТИПА ЭКСПЛАНТА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ИНДУКЦИИ НЕПРЯМОГО ОРГАНОГЕНЕЗА ПОБЕГОВ У КЛЕЩЕВИНЫ СОРТА ЗАНЗИБАР ГРИН В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS AND EXPLANT TYPE ON THE INDUCTION OF EFFECTIVE *IN VITRO* CASTOR BEAN SHOOT ORGANOGENESIS (CV. ZANZIBAR GREEN)

Д. В. Демиденко[1], Н. В. Варламова[1], М. Р. Халилуев[1,2]

[1] *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва*
[2] *Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва*

D. V. Demidenko[1], N. V. Varlamova[1], M. R. Khaliluev[1,2]

[1] *All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow*
[2] *Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy*

✉ Frankenvini1998@mail.ru

Аннотация

В работе продемонстрирован эффективный и быстрый протокол индукции соматического органогенеза побегов клещевины сорта Занзибар Грин в условиях *in vitro* для ювенильных фрагментов гипокотилей. 7-суточные фрагменты гипокотилей показали высокий регенерационный потенциал на всех типах питательных сред в сравнении с другими типами эксплантов.

Abstract

In this work, an effective and rapid protocol for inducing *in vitro* somatic organogenesis of castor bean shoots of the Zanzibar Green variety for juvenile hypocotyl fragments was demonstrated. 7-day fragments of hypocotyls showed a high regeneration potential on all types of culture medium in comparison with other types of explants.

Клещевина обыкновенная (*Ricinus communis* L.) является широко распространенной тропической сельскохозяйственной культурой, в основном выращиваемой для получения касторового масла, используемого во многих отраслях: фармакологии, косметологии, аэрокосмической, текстильной и легкой промышленностях и др. [1]. Кроме того, клещевина как техническая высокомасличная культура считается перспективной сырьевой альтернативой при производстве биодизеля [2, 3]. В то же время пищевое использование жмыха семян клещевины в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных ограничено высокой токсичностью из-за наличия в его составе белка рицина, который способен ингибировать биосинтез белка [4]. Детоксикация рицина методами термической и химической обработки семян значительно снижает их питательные свойства [5], в связи с чем получение растений клещевины с пониженным или редуцированным содержанием рицина с использованием методов генетической инженерии является довольно перспективной задачей. В свою очередь, разработка эффективного протокола соматического органогенеза побегов является неотъемлемым этапом в получении трансгенных и (или) генно-редактированных растений.

Таким образом, цель настоящего исследования — подбор типа и возраста экспланта, а также условий культивирования для разработки эффективного протокола соматического органогенеза побегов клещевины сорта Занзибар Грин в условиях *in vitro*.

Культивирование эксплантов, отличных по возрасту (7-суточные и 21-суточные гипокотили), предварительной подготовке (крупно- и мелконарезанные фрагменты стебля), а также по морфологии (гипокотили, стебли и черешки листьев), производили на питательной среде по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением регуляторов роста следующего состава:

1) MS + 5 мг/л 6-БАП + 0,1 мг/л ИУК + 5 мг/л $AgNO_3$;
2) MS + 0,25 мг/л тидиазурона (ТДЗ) + 0,1 мг/л ИУК + 5 мг/л $AgNO_3$;
3) MS + 1 мг/л зеатина + 0,1 мг/л ИУК + 5 мг/л $AgNO_3$;

Все типы эксплантов были получены из асептических семян клещевины сорта Занзибар Грин, предварительно введенных в культуру *in vitro* согласно стандартному протоколу стерилизации с использованием хлорсодержащих агентов.

© Д. В. Демиденко, Н. В. Варламова, М. Р. Халилуев, 2024

Для получения 7-суточных гипокотилей использовали отдельный протокол, включающий этапы извлечения гипокотиля из проросшего семени, отсечения зародышевого корня и зародышевого побега, прекультивации в течение 7 сут. на ранее описанных средах для индукции органогенеза и повторное отсечение краев экспланта для исключения попадания меристематических клеток корня и стебля. Продолжительность культивирования составила 42 сут. Экспланты пассировали на новую питательную среду через каждые 14 сут.

Несмотря на высокую способность к калусообразованию у всех типов эксплантов (63–100 %) независимо от состава питательной среды, регенерационная способность для каждого типа экпланта была индивидуальна и варьировала в том числе в зависимости от возраста экспланта и его размера. Наиболее высокий морфогенетический потенциал на всех типах питательных сред был выявлен для 7-суточных фрагментов гипокотилей и составил порядка 50 %. На среде с тидиазуроном этот показатель достиг 67,5 %, что является наибольшим показателем частоты регенерации среди всех эксплантов. При этом среднее количество регенерантов на одном экспланте было равно 6,7. В то время как у 21-суточных фрагментов гипокотилей каллусная ткань оказалась неморфогенной, о чем свидетельствовало полное отсутствие регенерантов на всех типах сред. Также было выявлено различие в регенерационной способности у крупных и мелких фрагментов стеблей, частота органогенеза которых на среде с зеатином составила 27,6 и 0,4 % соответственно. Для черешков листьев этот показатель не превышал 1 %. При этом на каждом срегенерировавшем экспланте наблюдалось не более одного регенеранта.

Таким образом, в среднем по всем вариантам питательных сред изученные экспланты расположились в следующей последовательности по частоте соматического органогенеза побегов: 7-суточные фрагменты гипокотилей (52,5 %) > крупные фрагменты стебля (11,6 %) > мелкие фрагменты стебля (0,4 %), черешки листьев (0,2 %), 21-суточные фрагменты гипокотиля (0 %).

В результате проведения данного эксперимента был разработан эффективный протокол соматического органогенеза побегов *in vitro* для клещевины сорта Занзибар Грин при культивировании 7-суточных фрагментов гипокотилей на среде с тидиазуроном, который в дальнейшем может быть использован для различных биотехнологических исследований, в том числе для генетической инженерии и геномного редактирования по получению растений клещевины с улучшенными сельскохозяйственными признаками.

Литература

1. Nitbani F. O., Tjitda P. J.P., Wogo H. E., Detha A. I. R. Preparation of ricinoleic acid from castor oil: a review // J. Oleo Sci. 2022. Vol. 71. P. 781–793.

2. Osorio-González C. S., Gómez-Falcon N., Sandoval-Salas F. et al. Production of biodiesel from castor oil: a review // Energies. 2020. Vol. 13. P. 2467.

3. Keera S. T., El Sabagh S. M., Taman A. R. Castor oil biodiesel production and optimization // Egypt. J. Pet. 2018. Vol. 27. P. 979–984.

4. Audi J., Belson M., Patel M. et al. Ricin poisoning: a comprehensive review // Jama. 2005. Vol. 294. P. 2342–2351.

5. Anandan S., Kumar G. A., Ghosh J., Ramachandra K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake // Japan. J. Forensic Sci. Tech. 2005. Vol. 120. P. 159–168.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-65

РЕКОМБИНАНТНЫЕ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ VHH, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ SARS-COV-2 *

RECOMBINANT VHH-BASED MULTIVALENT ANTIBODIES BROADLY NEUTRALIZING SARS-COV-2 VARIANTS

П. Ю. Десюкевич, П. П. Солодков, Т. Н. Беловежец, А. Н. Чикаев

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск

P. Y. Desyukevich, P. P. Solodkov, T. N. Belovezhets, A. N. Chikaev

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk

✉ p.desyukevich@g.nsu.ru

Аннотация

Высокая генетическая изменчивость SARS-CoV-2 приводит к появлению новых вариантов вируса, устойчивых к большинству авторизованных моноклональных антител. В этой работе мы сконструировали новую панель биспецифичных антител на основе наноантител ламы против трех разных эпитопов RBD S-белка SARS-CoV-2. Созданные антитела эффективно нейтрализовали весь спектр вариантов SARS-CoV-2, включая сублинии JN.1 и KP.2, а также сарбековирус SARS-CoV-1.

Abstract

The high genetic variability of SARS-CoV-2 leads to the emergence of new escape variants that are resistant to most currently available therapeutic monoclonal antibodies. In this study, we developed a panel of novel bispecific antibodies derived from llama nanobodies targeting three distinct epitopes in the SARS-CoV-2 spike RBD. These newly derived antibodies were shown to potently neutralize a wide range of SARS-CoV-2 variants including JN.1 and KP.2 Omicron sublineages, as well as genetically related SARS-CoV-1 sarbecovirus.

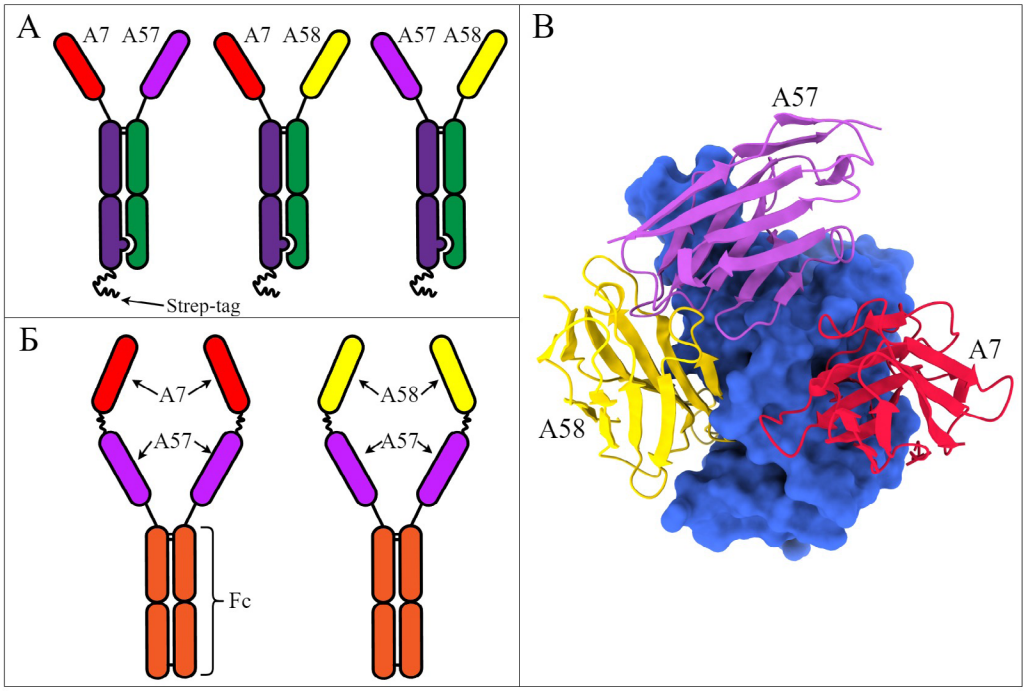
Прошедшая пандемия COVID-19 оказала глобальный эффект на здоровье всего населения, а также придала мощный импульс разработке средств противодействия коронавирусной инфекции. Тем не менее вирус по-прежнему активно циркулирует в популяции и, хотя и не несет непосредственной угрозы подавляющему большинству населения, остается смертельно опасным для отдельных категорий людей с ослабленным иммунитетом. Основным средством защиты для них служит пассивная иммунизация с использованием терапевтических моноклональных антител (МКА). Однако существенной проблемой является высокая генетическая изменчивость SARS-CoV-2, которая способствует появлению резистентных вариантов вируса, крайне плохо поддающихся нейтрализующему действию антител. На данный момент из 10 МКА, авторизованных для экстренного применения, лишь одно нейтрализует распространенные сегодня варианты сублинии JN.1. В связи с этим разработка антител, способных нейтрализовать не только существующие штаммы SARS-CoV-2, но и потенциальные будущие его варианты, остается важнейшей задачей. Многообещающим подходом к ее решению является создание би- или олигоспецифических молекул на основе вируснейтрализующих антител широкого спектра действия.

Ранее мы сообщали о получении четырех SARS-CoV-2-специфичных однодоменных антител (A7, A21, A57 и A58). Было показано, что все они обладают широким спектром противовирусной активности и при этом распознают различные эпитопы в составе RBD домена S-белка [1]. Цель настоящей работы заключалась в использовании полученных наноантител для конструирования различных вариантов Fc-димеризованных биспецифических молекул, а также в оценке их противовирусных свойств *in vitro* и *in vivo*.

В сборке конструкций использовали 3 наноантитела VHH: A7, A57 и A58, а реализация включала разные варианты димеризации молекул. Первая группа была сконструирована с использованием технологии Knobs-into-Holes (KiH), позволяющей получать биспецифические антитела путем объединения гетерологичных мономерных субъединиц за счет избирательного взаимодействия модифицированных Fc-фрагментов (рисунок, *А*). Вторая группа антител представляла собой тетравалентные биспецифичные гомодимеры (см. рисунок, *Б*). Нейтрализующую активность оценивали с помощью широкой панели лентивирусов, псевдотипированных спайк-белками

* Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение 075-15-2021-1086, контракт № РФ—193021X0015, 15.ИП.21.0015).

© П. Ю. Десюкевич, П. П. Солодков, Т. Н. Беловежец, А. Н. Чикаев, 2024



А — схема строения KiH-гетеродимера; *Б* — схема строения гомодимера вида VHH_i-VHH_j-Fc; *В* — трехмерная модель структуры комплексов VHH на RBD S-белка SARS-CoV-2, полученная с помощью анализа конкурентного связывания, *in silico* моделирования и молекулярного докинга

различных вариантов SARS-CoV-2 (включая распространенные в 2024 г. варианты JN.1 и KP.2), а также родственного сарбековируса SARS-CoV-1. Полученные биспецифические гомо- и гетеродимеры обладали выраженным синергическим эффектом нейтрализации относительно мономерных VHH, а также имели более равномерные показатели нейтрализации в сравнении с ранее описанными моноспецифичными Fc-гомодимерами [1]. Эксперименты *in vivo*, проведенные на гуманизированных по ACE2 мышах с использованием штамма SARS-CoV-2 JN.1, показали, что тетравалентные конструкции обеспечивают эффективную защиту мышей от вируса, предотвращая потерю веса и гибель животных. Таким образом, сконструированные нами антитела нейтрализуют все основные линии вариантов SARS-CoV-2 и потенциально могут быть использованы как средства профилактики и терапии коронавирусной инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом. Благодаря своей биспецифичности новые антитела способны более эффективно противодействовать мутационному ускользанию вируса.

Литература

1. Solodkov P. P. et al. Serial Llama Immunization with Various SARS-CoV-2 RBD Variants Induces Broad Spectrum Virus-Neutralizing Nanobodies // Vaccines. 2024. Vol. 12, № 2. P. 129.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-66

СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ РОДА *BACILLUS*, ОБЛАДАЮЩИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ *E. COLI*

SCREENING OF COLLECTION STRAINS OF THE GENUS *BACILLUS* WITH ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST *E. COLI*

Д. Е. Дудник, А. Н. Иркитова, А. В. Малкова, Е. Н. Кожевникова

Алтайский государственный университет, Барнаул

D. E. Dudnik, A. N. Irkitova, A. V. Malkova, E. N. Kozhevnikova

Altai State University, Barnaul

✉ dudnik-dina@mail.ru

Аннотация

Способность к подавлению патогенной микрофлоры является главным критерием отбора штаммов при создании биологических препаратов для животноводства. Данное исследование направлено на изучение антагонистической активности в отношении кишечной палочки штаммов *Bacillus* spp. из коллекции ИЦ «Промбиотех».

Abstract

The ability to suppress pathogenic microflora is the main criterion for selecting strains when creating biological preparations for animal husbandry. The study is aimed at studying the antagonistic activity of *Bacillus* spp. strains from the collection of the Prombiotech Engineering Center against *E. coli*.

Бактерии рода *Bacillus* благодаря обширному набору полезных свойств активно используются в биотехнологических производствах. Бациллы способны к продукции различных антимикробных метаболитов, что делает их перспективными агентами биоконтроля. Препараты на основе бактерий рода *Bacillus* имеют широкий спектр применения в области животноводства. Перспективным направлением здесь является использование бациллярных препаратов для коррекции микробного фона помещений, в которых содержатся животные. Практика применения таких средств демонстрирует положительное влияние на уровень обсемененности патогенными микроорганизмами объектов окружающей среды [1].

Разработка микробных препаратов для модуляции микрофлоры помещений начинается со скрининга штаммов, обладающих антагонистической активностью в отношении болезнетворных микроорганизмов, широко распространенных в данной среде. Одним из таких инфекционных агентов является *E. coli*.

Цель исследования — скрининг бациллярных штаммов в коллекции Инжинирингового центра «Промбиотех» АлтГУ, обладающих антагонистической активностью в отношении *E. coli*. В качестве объектов исследования были использованы 17 штаммов *Bacillus* spp. Исследуемые штаммы были выделены из естественных и сельскохозяйственных источников.

В качестве тест-культур использовали 6 штаммов *E. coli*, выделенные из подстилок сельскохозяйственных помещений. Все штаммы выращивали на L-бульоне в течение 24 ч при 37 °С и вращении 200 об/мин. Непосредственно определение антагонистической активности проводили на L-агаре. Способность к подавлению культур кишечной палочки оценивали методом перпендикулярных штрихов [2].

В результате исследования было установлено, что 16 штаммов бацилл (94 %) обладают антагонистической активностью в отношении *E. coli*. При этом подавление всех тест-культур отмечено только для 4 штаммов (24 %). Размер зон угнетения роста тест-культур представлен в таблице.

Подавление роста и жизнедеятельности *E.coli* бациллами опосредовано продукцией низкомолекулярных антимикробных метаболитов, диффундирующих в агар. Отсутствие антагонизма у штаммов *Bacillus* spp. в отношении *E.coli* указывает на их неспособность синтезировать соединения, угнетающие рост грамотрицательных бактерий. Помимо этого, культуры *E.coli* могут ингибировать антимикробные метаболиты бацилл [3].

Таким образом, 94 % штаммов *Bacillus* spp. из коллекции ИЦ «Промбиотех» обладают антагонистической активностью в отношении *E.coli*. Наиболее широкий спектр активности установлен для 24 % штаммов, из кото-

© Д. Е. Дудник, А. Н. Иркитова, А. В. Малкова, Е. Н. Кожевникова, 2024

рых максимальные зоны задержки роста тест-культур показал штамм *B. licheniformis* 6. Данные штаммы могут быть использованы для создания биологических препаратов, направленных на коррекцию микробного фона животноводческих помещений.

Антагонистическая активность штаммов *Bacillus* spp.

Исследуемый штамм	Тест-культура					
	E.coli Pr4	*E.coli* 6T	*E.coli* 9T	*E.coli* 10T	*E.coli* 11T	*E.coli* 12T
	Зона угнетения роста, мм					
B. licheniformis 5	–	3,7 ± 0,1	3,0 ± 0,0	–	–	–
B. licheniformis 6	8,5 ± 0,3	7,0 ± 0,2	11,0 ± 0,5	7,5 ± 0,2	8,1 ± 0,4	10,0 ± 0,5
B. licheniformis 8	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
B. licheniformis 10	–	–	–	–	–	–
B. pumilus 4	–	3,0 ± 0,0	5,0 ± 0,2	–	–	–
B. pumilus 5	–	3,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	–	–	–
B. pumilus 6	–	3,3 ± 0,1	3,5 ± 0,0	–	–	–
B. pumilus 7	–	4,0 ± 0,0	4,7 ± 0,2	–	–	–
B. pumilus 16	–	3,7 ± 0,1	4,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	–	–
B. firmus 1	–	4,0 ± 0,0	–	–	–	–
B. firmus 2	–	4,0 ± 0,0	4,7 ± 0,1	–	–	–
B. firmus 3	2,7 ± 0,1	5,0 ± 0,0	4,0 ± 0,0	–	–	–
B. subtilis 1/8	1,0 ± 0,0	3,7 ± 0,1	3,0 ± 0,0	–	–	–
B. mojavensis 9	–	2,3 ± 0,1	2,0 ± 0,0	–	–	–
B. toyonensis 15	–	4,0 ± 0,0	5,7 ± 0,2	2,0 ± 0,1	–	–
B. atrophaeus 1	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,0 ± 0,1	2,0 ± 0,0	2,7 ± 0,1	3,0 ± 0,0
B. atrophaeus 7	1,0 ± 0,0	4,0 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,0

Примечание. Тире означает, что антагонизм не зафиксирован.

Литература

1. Guéneau V., Rodiles A., Frayssinet B. et al. Positive biofilms to control surface-associated microbial communities in a broiler chicken production system — a field study // Front Microbiol. 2022. Vol. 13. P. 1–14.

2. Байгазанов А. Н., Финогенов А. Ю., Нуркенова М. К. и др. Антагонистические свойства бациллярных пробиотических штаммов // Авиценна. 2017. № 10. С. 7–10.

3. Sumi C. D., Yang B. W., Yeo I. C., Hahm Y. T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics // Can. J. Microbiol. 2015. Vol. 2. P. 93–103.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-67

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NANOPARTICLES WITH GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR

А. Ю. Евстратова[1], Н. С. Шастина[1], О. А. Баранова[2], А. В. Чеканов[2], Д. В. Товпеко[3], М. О. Соколова[3], А. К. Иванова[3], 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 Минздрава России, Москва
[3]Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург

A. Y. Evstratova[1], N. S. Shastina[1], O. A. Baranova[2], A. V. Chekanov[2], D. V. Tovpeko[3], M. O. Sokolova[3], A. K. Ivanova[3], E. Yu. Solov'eva[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]Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg

✉ evstratova.anastasya.8@yandex.ru

Аннотация

Получены липосомы (Лс) с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором (Г-КСФ), с размером частиц от 100 до 280 нм, характеризующиеся высокой степенью включения в липосомы и дисперсионной стабильностью при длительном хранении при Т +4 °С. Также показано, что Лс с Г-КСФ обладают выраженными антиоксидантными свойствами.

Abstract

Liposomes (Lc) with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), with a particle size of 100–280 nm were obtained, characterized by a high encapsulation efficiency in liposomes and dispersion stability during long-term storage at T +4 °C. It has also been shown that drugs with G-CSF have pronounced antioxidant properties.

Сосудистые заболевания головного мозга являются серьезным и распространенным заболеванием центральной нервной системы, часто приводящим к летальным исходам. Ишемический процесс является ключевым фактором 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, что приводит к повреждению и гибели нейронов головного мозга. Таким образом, при комплексной терапии этой патологии важно использовать препараты, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) — один из представителей цитокинов — гликопротеин, который выполняет множество функций как в физиологических, так и в патологических процессах. Однако систематическое введение этого вещества может вызывать различные побочные эффекты, что может ограничить его эффективность.

Поэтому **целью исследования** является получение липосом с Г-КСФ для защиты его от биодеградации, пролонгированного действия, а также исследование биологической активности наночастиц с Г-КСФ на нейтрофилах.

Вначале получали фосфатидилхолиновые (ФХ) липосомы с Г-КСФ диспергированием липидной пленки фосфатным буферным раствором (ФБР, pH 7,4) или физиологическим раствором (pH 5,7), содержащим цитокин, с последующей экструзией.

Таким образом, были получены ФХ-липосомы с Г-КСФ с размером частиц в диапазоне от 100 до 280 нм. Степень включения активной субстанции в липосомы варьировалась от 30 до 90 в зависимости от pH среды и концентрации активной субстанции (0,5–1 мг/мл). Необходимо отметить, что при уменьшении pH среды (7,4 → 5,7) происходило увеличение степени включения Г-КСФ в липосомы. Показано, что полученные на-

© А. Ю. Евстратова, Н.С.Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, Д. В. Товпеко, М. О. Соколова, А. К. Иванова, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, В. А. Щелконогов, 2024

ночастицы с Г-КСФ были гомогенными, электронейтральными и дисперсионно стабильными при длительном хранении при Т +4 °С.

Методом сканирующей электронной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии было определено, что наночастицы с Г-КСФ представляют собой гетерогенную систему разного размера и формы частиц (сферические, нанотрубки, «нанодоски»), а также установлена нитевидная структура, предположительно, гидрофильного фрагмента белка на поверхности липосом.

Одними из форменных элементов крови являются нейтрофилы, способные генерировать АФК в присутствии различных активаторов или при воспалительных процессах. В данной работе оценивалось антиоксидантное действие липосом с Г-КСФ на активированных нейтрофилах в сравнении с водным раствором активной субстанции и «пустых» Лс. В качестве активатора нейтрофилов использовали форбол-12-миристат-13-ацетат (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 липосом с Г-КСФ (0,8–4 мкМ) приводило к значительному уменьшению (примерно 2,5–30 раз) интенсивности хемилюминесценции, обусловленной протеканием свободнорадикальных процессов в нейтрофилах, активированных с помощью ФМА, по сравнению с контролем. Наиболее эффективным антиоксидантным действием обладали липосомы с Г-КСФ при использовании максимально исследуемой концентрации гликопротеина. Водный раствор Г-КСФ (0,8–4 мкМ) и «пустые» липосомы также проявляли антиоксидантные свойства в выбранной клеточной модели, снижая концентрацию АФК примерно в 2–3,5 раза.

Таким образом, липосомы с Г-КСФ являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vitro*.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-68

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЭКСТРАКТАХ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК

DETERMINATION OF THE TOTAL CONTENT OF POLYPHENOLS IN EXTRACTS OF VARIOUS MEDICINAL PLANTS FOR THE PRODUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITIVES

А. И. Егорова, В. Г. Сергеев

Удмуртский государственный университет, Ижевск

A. I. Egorova, V. G. Sergeev

Udmurt State University, Izhevsk

✉ ealiapril@gmail.com

Аннотация

Изучено суммарное содержание полифенолов в экстрактах некоторых лекарственных растений (*Solidago canadensis* L., *Aegopodium podagraria*, *Tanacetum vulgare*) спектрофотометрическим методом с использованием реактива Фолина — Чокальтеу, а также подобраны оптимальные условия для их наиболее эффективного извлечения с целью использования данных экстрактов в производстве биологически активных добавок.

Abstract

The total content of polyphenols in extracts of some medicinal plants (*Solidago canadensis* L., *Aegopodium podagraria*, *Tanacetum vulgare*) was studied by spectrophotometric method using Folin-Chocalteu reagent, and optimal conditions for their most effective extraction were selected in order to use these extracts in the production of biologically active additives.

В настоящее время наблюдается тенденция к расширению использования лекарственных препаратов растительного происхождения, применение которых обусловлено их относительной безопасностью и обширным фармакологическим действием. Полифенольные соединения, содержащиеся в различных лечебных растениях, имеют высокий потенциал для использования в качестве биологически активных добавок [1]. Поэтому очень важным аспектом исследования на данный момент является подбор оптимальных условий для экстрагирования полифенолов из растительного сырья и определение их биохимического состава.

В данной работе исследовалось суммарное содержание полифенолов в экстрактах некоторых лекарственных растений, таких как золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.), сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria*) и пижма обыкновенная (*Tanacetum vulgare*).

Экстрагирование растительной массы проводили в водно-спиртовой среде при температуре 45 °С, после чего исследуемый раствор отфильтровывали через бумажный фильтр. Суммарную концентрацию полифенольных соединений в фильтрате после экстракции определяли спектрофотометрическим методом в кюветах l = 10 мм, при длине волны λ = 750 нм, основанном на образовании вольфрамовой сини, придающей исследуемому раствору синий цвет в результате взаимодействия фенолов с реактивом Фолина — Чокальтеу [2, 3].

Концентрацию суммы полифенолов в пересчете на абсолютно сухое сырье определяли по следующей формуле [4]:

$$X,\% = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{m \cdot V_a \cdot (100 - W)},$$

где C — концентрация полифенолов в исследуемом растворе (рассчитывается по градуировочному графику), г/100 см^3; V_1, V_2 — объемы мерных колб, использованных для приготовления анализируемого раствора, см^3; m — масса растительного сырья, г; V_a — объем аликвоты, см^3; W — потеря в массе при высушивании, %.

В ходе исследования на примере золотарника канадского было получено, что оптимальным временем для извлечения полифенолов из растительного сырья является 90 мин (табл. 1).

© А. И. Егорова, В. Г. Сергеев, 2024

Таблица 1

Определение оптимального времени извлечения полифенолов

Время экстракции, мин	Суммарное содержание полифенолов, %
10	6,55
30	6,73
60	6,86
90	7,00
120	7,02

Далее, в рамках исследования были изучены разные концентрации этилового спирта для наиболее эффективного извлечения полифенольных соединений из растительного сырья. Результаты эксперимента, проведенного на листьях и соцветиях золотарника канадского, отражены в табл. 2. Как оказалось, максимальное количество суммарных полифенолов переходит в раствор при экстракции 40 % спиртом: для листьев это 7,80 %, а в случае с соцветиями — 9,19 %. Поэтому дальнейшие опыты проводились с использованием растворов с данной концентрацией этанола.

Таблица 2

Определение оптимальной концентрации этилового спирта для эффективного извлечения полифенолов из растительной массы

Концентрация этилового спирта, %	Суммарное содержание полифенолов у золотарника канадского, %	
	Листья	Соцветия
0	4,86	4,91
20	6,88	7,11
40	7,80	9,19
60	7,05	8,64
90	6,49	7,91

Исследование также включало определение суммарного содержания полифенолов в экстрактах из листьев сныти обыкновенной и пижмы обыкновенной, которое составило 9,33 и 7,53 % соответственно.

Таким образом, рассмотрены методы извлечения полифенольных соединений в различных условиях и проведена оценка содержания суммы активных компонентов лекарственных растений в водных и водно-спиртовых экстрактах. Установлено, что водная экстракция приводит к меньшему выходу полифенолов по сравнению с водно-спиртовой экстракцией. Максимальное содержание полифенольных соединений наблюдается при извлечении в 40%-м этаноле из соцветий золотарника канадского и листьев сныти обыкновенной. Полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале использования данных растений для производства биологически активных добавок благодаря их способности накапливать значительное количество полифенолов.

Литература

1. Денисенко Т. А., Вишникин А. Б., Цыганок Л. П. Спектрофотометрическое определение суммы фенольных соединений в растительных объектах с использованием хлорида алюминия, 18-молибдодифосфата и реактива Фолина — Чокальтеу // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 4. С. 373–380.

2. Agbor G. A., Vinson J. A., Donnelly P. E. Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay // Int. J. Food Sci. Nutr. Diet. 2014. Vol. 3 (8). P. 147–156.

3. Николаева Т. Н., Лапшин П. В., Загоскина Н. В. Метод определения суммарного содержания фенольных соединений в растительных экстрактах с реактивом Фолина — Дениса и реактивом Фолина — Чокальтеу: модификация и сравнение // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 291–299.

4. Леонова В. Н., Попов И. В., Попова О. И. и др. Количественное определение суммы фенольных соединений в плодах *Rhus typhina(L.)* // Химия растительного сырья. 2019. № 1. С. 225–232.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-69

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ *R. ANDROPOGONIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЗЛАКОВ

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF R. ANDROPOGONIS STRAINS ISOLATED FROM INFECTED CEREAL PLANTS

А. Н. Игнатов[1], Е. В. Матвиенко[2]

[1] *Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва*
[2] *Поволжский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства им. П. Н. Константинова, Кинель*

A. N. Ignatov[1], E. V. Matvienko[2]

[1] *Peoples' Friendship University of Russia named after P. Lumumba, Moscow*
[2] *Volga Research Institute of Plant Breeding and Seed Science, Kinel*

✉ opel0076687@yandex.ru

Аннотация

Характерные симптомы бактериоза, вызываемого *Robbsia andropogonis* на растениях сорго и кукурузы, были обнаружены в двух областях Поволжья в 2018–2020 гг. Семь бактериальных изолятов с морфологией, сходной с *R. andropogonis*, были получены из пораженных листьев. Видовая принадлежность была доказана с помощью фенотипических тестов и секвенирования генов 16S рРНК, rpoD и gyrB.

Abstract

Characteristic symptoms of bacteriosis caused by Robbsia andropogonis on sorghum and maize plants were detected in two regions of the Volga region between 2018 and 2020. Seven bacterial isolates with morphology similar to R. andropogonis were obtained from affected leaves. Species affiliation was confirmed using phenotypic tests and sequencing of the 16S rRNA, rpoD and gyrB genes.

Robbsia andropogonis (син.: *Pseudomonas andropogonis* [1, 2]; *Burkholderia andropogonis*; *Paraburkholderia andropogonis* [3]) — фитопатоген, вызывающий экономические потери во всем мире. Впервые вызываемое им заболевание было описано как бактериальная полосатость листьев кукурузы (*Zea mays*), суданской травы (*Sorghum* × *drummondii*) и сорго (*S. bicolor*) [4, 5].

Патоген относится к группе граммотрицательных бактерий, обладает окислительным метаболизмом [5–8] и одним полярным жгутиком [9]. Молекулярная диагностика R. *andropogonis* не стандартизирована [10–13], и поэтому определение *R. andropogonis* проводится на основе комплекса морфологических, физиологических и генетических признаков. Патоген дает положительные реакции на каталазу и образование поли-β-гидроксибутирата, но отрицательные — на оксидазу, аргининдигидролазу, восстановление нитратов, образование флуоресцентного пигмента на агаре Кинга Б и на разжижение желатина.

Секвенирование одного или нескольких подходящих генетических маркеров может дать представление о таксономической структуре этой группы [14]. Считается, что последовательностей 16S рРНК, gyrB и rpoD достаточно для достоверной идентификации *R. andropogonis* [15].

В настоящем исследовании были проведены фенотипические и генотипические характеристики штаммов *R. andropogonis*, выделенных из инфицированных растений злаков.

Отбор проб и выделение бактерий

Характерные симптомы полосатости на листьях были обнаружены в областях Поволжья в 2018–2020 гг. Зараженные растения были собраны и доставлены в лабораторию, где листья с симптомами поверхностно стерилизовали 10%-м раствором коммерческого препарата «Белизна» (гипохлорит натрия) в течение 10 с с последующим трехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Ткань листьев разрезали скальпелем на небольшие кусочки (2–3 мм в длину и ширину) и помещали в капли стерильной воды на 5 мин, дожидаясь выхода бактерий из листьев. Капли суспензии микробиологической петлей наносили на агаризованную среду Кинга В [16].

Инокулированные чашки Петри со средой инкубировали при 28 °С и проверяли на рост бактериальных колоний в течение 5 последующих дней. Колонии бактерий, морфологически сходных с *R. andropogonis* [17],

© А. Н. Игнатов, Е. В. Матвиенко, 2024

пересевали для проверки их чистоты и сохраняли на среде YDC при температуре 4 °C до их окончательной идентификации (см. таблицу).

Бактериальные штаммы, использованные в данном исследовании, и их происхождение, дата выделения и анализы диапазона хозяев

№ штамма	Место и год выделения	Растение-хозяин	Вирулентность для					Доля сходства с соответствующими генами из генома штамма LMG 2129T*, %		
			Zea mays	Sorghum bicolor	Hordeum vulgare	Phaseolus vulgaris	Pisum sativum	*16S рРНК*	*gyrB*	*rpoD*
1	2019	Zea mays	++	+	–	+	+	99,90	98,60	99,86
2	2019	Zea mays	++	+	–	+	+	99,80	98,71	99,90
3	2020	Zea mays	++	++	+	+	–	99,93	99,10	99,50
4	2020	Zea mays	++	+	–	+	+	99,96	99,30	99,32
5	2018	Sorghum bicolor	++	++	+	–	–	99,78	98,81	99,02
6	2019	Sorghum bicolor	++	++	+	+	–	99,93	98,91	99,42
7	2019	Sorghum bicolor	++	++	+	+	+	99,86	90,89	99,31
LMG 2129T	–	–	+	+	+	+	+	100,0	100,0	100,0

* геном Robbsia andropogonis LMG 2129T — образец GCF_902833845.1

Фенотип бактериальных штаммов

Все изоляты прошли первоначальное тестирование, включая выполнение теста Рю с 3 % KOH [18]. Оксидазу, гидролиз желатина, аргининдигидролазу и утилизацию источников углерода проводили в соответствии с ранее описанными методами [19]. Для теста на накопление поли-β-гидроксибутирата изоляты выращивали на среде с красителем Nile Blue (NB) [20] при 28 °C в течение 4 дней. Флуоресцентные включения наблюдали в длинноволновом ультрафиолетовом свете. Наличие гиперчувствительной реакции на листьях табака (*Nicotiana tabacum cv. Xanthi*) проверяли после инъекции 10^8 КОЕ·мл$^{-1}$ в лист с помощью шприца и гиподермальной иглы в течение 48 ч.

Тесты на патогенность и диапазон хозяев

Все изоляты были использованы для заражения ряда потенциальных растений-хозяев. Молодые листья были инокулированы суспензией изолятов 10^7 КОЕ·мл$^{-1}$. Для каждого изолята было протестировано по 4 растения каждого вида (см. таблицу). Стерильная вода была использована в качестве отрицательного контроля.

Листья инокулировали методом поверхностного нанесения суспензии бактерий с карборундом. Инокулированные и контрольные растения держали в климатической камере при постоянной температуре 28 °C и относительной влажности воздуха 80 % с 16-часовым фотопериодом.

Литература

1. Smith E. F. Bacteria in Relation to Plant Diseases // Carnegie Institution of Washington. Washington, DC, 1911. URL: https://www.biodiversitylibrary.org/item/60542

2. Stapp C. Schizomycetes (Spaltpilze oder Bakterien) // Handb. Pflanzenkrankheiten. 1928. Vol. 2. P. 286–287.

3. Sawana A., Adeolu M. and Gupta R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: Proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species // Front. Genet. 2014. Vol. 5. P. 1–22. URL: https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00429

4. Smith E. F. Bacteria in Relation to Plant Diseases // Carnegie Institution of Washington. Washington, DC, 1905. URL: https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/20583

5. Ullstrup J. A. Bacterial stripe of corn // Phytopathology. 1960. Vol. 50. P. 906–910.

6. Anderson D. Bacterial leaf spot of statice caused by Pseudomonas andropogonis // Plant Dis. 1994. Vol. 78. P. 1218C. URL: https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1994Abstracts/PD_78_1218C.htm

7. Caruso F. L. Bacterial blight of chickpea incited by Pseudomonas andropogonis // Plant Dis. 1984. Vol. 68. P. 910. URL: https://doi.org/10.1094/PD-68-910

8. Kobayashi D. Y. A bacterial leaf spot of highbush blueberry hardwood cuttings caused by Pseudomonas andropogonis // Plant Dis. 1995. Vol. 79. P. 839. URL: https://doi.org/10.1094/PD-79-0839

9. Lelliott R. A., Stead D. E. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants // Methods Plant Pathology. 1st Ed. Blackwell, Oxford, UK, 1987.

10. Fuerst J. A., Hayward A. C. The sheathed flagellum of Pseudomonas stizolobii // J. Gen. Microbiol. 1969. Vol. 58. P. 239–245. URL: https://doi.org/10.1099/00221287-58-2-239

11. Bagsic R. D., Fegan M., Li X. and Hayward A. C. Construction of species-specific primers for Pseudomonas andropogonis based on 16S rDNA sequences // Lett. Appl. Microbiol. 1995. Vol. 21. P. 87–92. URL: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01013.x

12. Duan Y. P., Sun X., Zhou L. J. et al. Bacterial brown leaf spot of citrus, a new disease caused by Burkholderia andropogonis // Plant Dis. 2009. Vol. 93. P. 607–614. URL: https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0607

13. Salles J. F., De Souza F. A. and Van Elsas J. D. Molecular method to assess the diversity of Burkholderia species in environmental samples // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68. P. 1595–1603. URL: https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1595-1603.2002

14. Slischuk H., Volkova N., Zakharova O. et al. Robbsia andropogonis molecular diagnostics markers design using bioinformatical approaches // International Congress on Oil and Protein Crops. Chişinău, Moldova, 2018.

15. Mechan-Llontop M. E., Tian L., Bernal-Galeano V. et al. Assessing the potential of culture-independent 16S rRNA microbiome analysis in disease diagnostics: the example of Dianthus gratianopolitanus and Robbsia andropogonis // Eur. J. Plant Pathol. 2019. Vol. 155. P. 1211–1223. URL: https://doi.org/10.1007/s10658-019-01850-8

16. Tayeb L. A., Lefevre M., Passet V. et al. Comparative phylogenies of Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences // Res. Microbiol. 2008. Vol. 159. P. 169–177. URL: https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.005

17. King E. O., Ward M. K. and Raney D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin // J. Lab. Clin. Med. 1954. Vol. 44. P. 301–307.

18. Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN, 2001. URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2338.1997.tb00648.x

19. Ryu E. A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining // Kitasato Arch. Exp. Med. 1940. Vol. 17. P. 58–63. URL: https://www.cabdirect.org/?target= %2fcabdirect %2fabstract %2f19412200657

20. Pierce L., Schroth M. N. Detection of Pseudomonas colonies that accumulate poly-beta-hydroxybutyrate on Nile blue medium // Plant Dis. 1994. Vol. 78. P. 683–685. URL: https://doi.org/10.1094/PD-78-0683

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-70

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ АЛЬБУМИНА, ИМПРИНТИРОВАННОГО ПИЩЕВЫМ ТОКСИНОМ *

MODELLING OF ALBUMIN STRUCTURE IMPRINTED WITH FOODBORNE TOXIN

П. М. Ильичева, П. С. Пиденко, Н. А. Бурмистрова

Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского

P. M. Ilicheva, P. S. Pidenko, N. A. Burmistrova

Saratov State University

✉ ilichevapm@gmail.com

Аннотация

В данной работе методами молекулярной динамики и молекулярного докинга проведено моделирование структуры бычьего сывороточного альбумина в присутствии молекул токсина пищевого происхождения, зеараленона, в условиях синтеза импринтированных белков. Изучены фундаментальные основы образования импринтированных белков и разработан комплекс рекомендаций для их рационального проектирования.

Abstract

In this work molecular dynamics and molecular docking were carried out to simulate the structure of bovine serum albumin (BSA) in the presence of foodborne toxin zearalenone molecules under conditions of imprinted proteins synthesis. The fundamental principles of the formation of imprinted proteins have been studied and insights into the rational design for IPs were submitted.

Создание импринтированных белков (ИБ) как синтетической альтернативы природным системам распознавания является важной задачей биотехнологии. Импринтинг белка предоставляет важную информацию, которую можно использовать для контроля различных функций нативных белков. Другими словами, этот метод предлагает универсальную платформу для различных биомедицинских и экологических приложений [1]. Например, ИБ на основе альбумина успешно использовались в качестве элемента распознавания в иммуноферментном анализе для определения токсинов пищевого происхождения [2, 3]. Однако имеющиеся знания по теоретическому изучению ИБ как систем распознавания ограничены. В связи с этим актуальным является моделирование структуры ИБ для понимания механизма их образования и повышения эффективности и безопасности производимой продукции.

В рамках работы проведено моделирование структуры бычьего сывороточного альбумина в присутствии молекул пищевого токсина, зеараленона, в условиях синтеза ИБ методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. Мы использовали комплексный и фундаментальный подход к импринтингу белков, используя комбинацию экспериментальных и теоретических методов, которые дают более исчерпывающую характеристику структурных изменений в белковой матрице.

Литература

1. Xu J., Miao H., Wang J. and Pan G. Molecularly imprinted synthetic antibodies: from chemical design to biomedical applications // Small. 2020. Vol. 16. P. 1906644.

2. Pidenko P., Zhang H., Lenain, P. et al. Imprinted proteins as a receptor for detection of zearalenone // Anal. Chim. Acta. 2018. Vol. 1040. P. 99–104.

3. Beloglazova N., Lenain P., Tessier M. et al. Bioimprinting for multiplex luminescent detection of deoxynivalenol and zearalenone // Talanta. 2019. Vol. 192. P. 169–174.

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 22-16-00102).

© П. М. Ильичева, П. С. Пиденко, Н. А. Бурмистрова, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-71

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ ТОКСИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

PROSPECTS FOR THE USE OF DESTRUCTOR BACTERIA IN BIOTECHNOLOGY FOR CLEANING THE ENVIRONMENT FROM TOXIC COMPOUNDS

Л. Р. Иминова

Пущинский филиал Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ)
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина, Пущино

L. R. Iminova

Pushchino Branch of Russian Biotechnological University (BIOTECH University)
Scriabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino

✉ uzdleila90@gmail.com

Аннотация

Неосторожная деятельность человека, агрессивное природопользование, активное применение сильнодействующих химических пестицидов, добыча полезных ископаемых — все это негативно влияет на состояние окружающей среды, непрерывно увеличивая концентрацию токсичных соединений в почве, воде и воздухе. Одним из наиболее эффективных способов очистки окружающей среды и восстановления плодородия является использование бактерий-деструкторов токсичных соединений. Цель исследования — поиск и выделение в чистую культуру бактерий, способных разлагать устойчивые загрязнители. В ходе исследования было выделено 150 штаммов, из них были отобраны изоляты, использующие фенол, толуол, углеводороды нефти, пестициды и хлорорганические соединения в качестве единственного источника углерода и энергии. Для ряда культур была показана высокая антимикробная и антифунгальная активность. Для культур, относящихся к родам *Rhodococcus*, *Bacillus*, была показана ростостимулирующая активность. Отобранные культуры послужили основой препаратов для биоремедиации почв и стимуляции роста растений.

Abstract

Careless human activity, aggressive environmental management, active use of highly effective chemical pesticides, mining — all this negatively affects the environment, continuously increasing the concentration of toxic compounds in soil, water and air. One of the most effective ways to clean the environment and restore fertility is the use of bacteria that destroy toxic compounds. The goal of this work was to search for and isolate into a pure culture bacterium capable of decomposing persistent pollutants. During the study, 150 strains were isolated, from which isolates were selected that used phenol, toluene, petroleum hydrocarbons, pesticides and organochlorines as the sole source of carbon and energy. High antimicrobial and antifungal activity were shown for a number of cultures. Growth-stimulating activity has been shown for crops belonging to the genera Rhodococcus and Bacillus. The selected crops served as the basis for preparations for soil bioremediation and plant growth stimulation.

В настоящее время одной из основных глобальных угроз международной безопасности являются экологические проблемы. Биологические методы очистки, включая микробную биодеградацию, обладают значительным потенциалом и преимуществами за счет их экологической безопасности и низких затрат [1].

Целью исследовательской работы являлся поиск и выделение в чистую культуру бактерий, способных к деструкции целевых соединений, относящихся к приоритетным загрязнителям окружающей среды, определение их биодеградативной активности, а также разработка эффективных биопрепаратов на их основе.

Почва является одним из основных источников выделения активных штаммов-деструкторов токсичных загрязнителей [2]. Чаще всего почвенные микроорганизмы, относящиеся к различным родам и видам, способны к трансформации и дальнейшей утилизации широкого спектра загрязнителей. Из образцов загрязненных и незагрязненных земель были выделены изоляты, способные к деструкции фенола, бензоата, нафталина, этилбензола, углеводородов нефти, пестицидов, толуола, изопрена, целлюлозы, а также хлорорганических соединений. Более 150 выделенных культур были проверены на способность использовать эти соединения в качестве единственного ростового субстрата в минеральной среде, при концентрации в среде фенолов от 0,1 до 3,0 г/л, нефти — 1–2 %, пиноксадена и толуола — до 0,5 %, тетрахлорметана — до 10 %. Культуры идентифицированы по гену 16S рРНК.

© Л. Р. Иминова, 2024

Определена их принадлежность к разным филогенетическим группам, *Pseudomonas, Rhodococcus, Microbacterium*, *Peribacillus, Georgenia, Leucobacter, Exiguobacterium, Bacillus*.

Для наиболее активных изолятов была показана способность накапливать биомассу при повышенной солености среды до 14 % в широком диапазоне температур от +3 до +55 °С. В ходе исследования была подтверждена ростостимулирующая активность выделенных штаммов по отношению к зерновым и бобовым культурам. Для бактерии, относящихся к роду *Bacillus*, охарактеризована антимикробная и антифунгальная активность в отношении фитопатогенов, включая представителей родов *Fusarium, Botrytis, Erwinia*. Исследование антибиотикорезистентности показало, что выделенные бактерии чувствительны к большинству из 80 протестированных широко применяемых антибиотиков.

Отобранные культуры имеют высокий биотехнологический потенциал и могут служить основой биопрепаратов для биоремедиации и органического земледелия.

Литература

1. Общая экология: учеб. / под ред. А. С. Степановских. М.: ЮНИТИ, 2000. С. 510.
2. Нетрусов А. И. Экология микроорганизмов: учеб. для студ. вузов. М., 2004. С. 272.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-72

МОНИТОРИНГ ПРОЦЕССА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОРЧИ МЯСНЫХ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ИНДИКАТОРОВ *

MONITORING OF MICROBIOLOGICAL SPOILAGE OF MEAT AND FISH PRODUCTS USING OPTICALLY ACTIVE INDICATORS

Я. А. Ионов, Д. Г. Хасанов, О. В. Фрейнкман, Е. А. Назарова

Институт SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург

Y. A. Ionov, D. G. Khasanov, O. V. Freinkman, E. A. Nazarova

SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

✉ ionov@scamt-itmo.ru

Аннотация

Потребители и производители часто сталкиваются с испорченными продуктами на разных этапах жизненного цикла. Разработанные флуоресцентные индикаторы на основе углеродных точек позволят отслеживать реальное состояние продукта внутри упаковки. Это поможет производителям быстрее находить критические точки на этапах хранения и транспортировки, а покупателям не беспокоиться о покупке товара несоответствующего качества.

Abstract

Consumers and manufacturers often encounter spoiled products at different stages of the product life cycle. Developed fluorescent indicators based on carbon dots will allow tracking the real state of the product inside the package. This will help manufacturers quickly find critical points at the stages of storage and transportation, and customers will not worry about buying goods of inappropriate quality.

Безопасность пищевых продуктов является важнейшим аспектом пищевой промышленности, но существующие методы контроля качества являются дорогостоящими, трудоемкими и отнимают много времени. Наиболее актуальным и современным способом решения данных проблем является умная упаковка. С помощью различных сенсоров и индикаторов в своем составе она может обеспечить непрерывный мониторинг состояния продукции, а также за счет дополнительных активных компонентов влиять на процессы, происходящие внутри упаковки, например, увеличивать срок хранения [1].

Главным параметром порчи мясных продуктов является количество условно-патогенных микроорганизмов на их поверхности. Допустимое количество микроорганизмов устанавливается нормативными документами [2], но вести их подсчет без нарушения герметичности упаковки не представляется возможным. Таким образом, важно разработать индикаторы, отслеживающие состояние продукции в режиме реального времени посредством реагирования на метаболиты, выделяемые микроорганизмами при порче в газовую фазу, и не требующие специальных навыков.

Углеродные точки могут быть перспективным материалом для сенсорных приложений и для создания умной упаковки благодаря своим флуоресцентным свойствам, нетоксичности и простоте синтеза [3, 4]. Так, они могут реагировать с изменением интенсивности флуоресценции на различные ионы или молекулы в растворе и газовой среде. Благодаря хорошей фотостабильности и чувствительности они с успехом применяются в аналитических тест-системах. В сфере умной упаковки углеродные точки могут применяться как компонент активной упаковки, придающий ей антибактериальные свойства [1].

В этой работе впервые предложено использование углеродных точек, синтезированных *in situ* на поверхности биополимера, для определения свежести мясных и рыбных продуктов. В качестве биополимера использовали нанокристаллический хитин, синтезированный путем кислотного гидролиза высокомолекулярных цепей [5]. Для удобства нанесения и формирования индикаторов были подобраны параметры гелирования с помощью различных агентов. Кроме того, были проведены всесторонние физико-химические исследования свойств углеродных точек и установлена корреляция между количеством микроорганизмов, вызывающих порчу продукта, и изменением оптического отклика при взаимодействии с метаболитами в газовой фазе. В процессе подсчета микро-

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 24-76-10093).

© Я. А. Ионов, Д. Г. Хасанов, О. В. Фрейнкман, Е. А. Назарова, 2024

организмов использовался метод окраски по Граму. Для количественного определения гашения флуоресценции использовалась разработанная приставка для смартфона, обеспечивающая постоянные и необходимые условия измерения. Для определения изменения флуоресценции на фотографиях, сделанных смартфоном в приставке, считали среднее значение оттенка серого тестовой зоны с помощью программы ImageJ. Гашение флуоресценции составило при комнатной температуре — 14 и 15 %, при холодильном хранении — 17 и 16 % к моменту, когда продукт не пригоден к употреблению, для образцов курицы и креветки соответственно.

Результаты данного исследования могут быть направлены на обеспечение непрерывного контроля качества на всех этапах жизненного цикла продукта вплоть до его реализации. Это позволит как снизить репутационные риски производителей и поставщиков, так и обеспечить дополнительную защиту здоровья населения.

Литература

1. Roy S., Ezati P., Rhim J.-W. Gelatin/Carrageenan-Based Functional Films with Carbon Dots from Enoki Mushroom for Active Food Packaging Applications // ACS Appl. Polymer Mater. 2021. Vol. 3, No. 12. P. 6437–6445.

2. ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции: Технический регламент Таможенного союза: изд. офиц.: введен впервые: дата введения 2011.12.09 // Комиссия Таможенного союза. 2021. 173 с.

3. Liu H., Zhong X., Pan Q. et al. A review of carbon dots in synthesis strategy // Coord. Chem. Rev. 2024. Vol. 498. P. 215468.

4. Deepika L., Kumar L., Gaikwad K. K. Carbon dots for food packaging applications // Sustainable Food Technol. 2023. Vol. 1, № 2. P. 185–199.

5. Ngo T. S., Tracey C. T., Navrotskaya A. G. et. al. Reusable carbon dot/chitin nanocrystal hybrid sorbent for the selective detection and removal of Cr(VI) and Co(II) ions from wastewater // Carbohydr. Polym. 2023. Vol. 304. P. 120471.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-73

ВЫДЕЛЕНИЕ И ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS* SPP.

IDENTIFICATION AND SPECIES IDENTIFICATION OF POTENTIAL PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA *LACTOCOCCUS LACTIS* SPP.

М. С. Каночкина[1,3], А. Р. Галимова[1,2], М. В. Виноградов[1]

[1]*Российский биотехнологический университет, Москва*
[2]*Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*
[3]*ООО «Микробные нутриенты иммунокорректоры», Москва*

M. S. Kanochkina[1,3], A. R. Galimova[1,2], M. V. Vinogradov[1]

[1]*Russian Biotechnological University, Moscow*
[2]*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow*
[3]*Microbial Nutrients Immunocorrectors, LLC, Moscow*

✉ alinkamx79@gmail.com

Аннотация

В ходе исследования было проведено выделение потенциальных пробиотических бактериальных культур рода *Lactococcus* из сырого коровьего молока, а также видовая идентификация определением фенотипических и биохимических свойств.

Abstract

The study was conducted to isolate potential prototic bacterial cultures of the genus *Lactococcus* from raw cow's milk, and species identification by the determination of phenotypic and biochemical properties.

Введение

Lactococcus lactis ssp. *lactis* является одной из важнейших заквасочных бактериальных культур, используемых в производстве молочных продуктов и имеет большое экономическое значение. Характеристика пробиотических и технологических свойств штаммов, выделенных из сырого молока, важна для производства функциональных молочных продуктов. *L. lactis* ssp. *lactis* могут быть использованы в качестве функциональных заквасок благодаря их антимикробной активности, высокой гидрофобности, антиоксидантной активности и способности деконъюгировать желчные соли [1]. Также *Lactococcus lactis* секретирует нетоксичный антибактериальный пептид низин, широко используемый бактериоцин для предотвращения порчи мясных и молочных продуктов, низин способен сохранять относительно высокую стабильность при низком pH [2].

Цель исследования — выделение потенциальных пробиотических молочнокислых бактерий рода *Lactococcus*, видовая идентификация выделенных штаммов.

Методы

Штаммы молочнокислых бактерий рода *Lactococcus* выделялись из сырого коровьего молока, проверенного на отсутствие споровых микроорганизмов. Образец свежего молока помещали в оптимальные для данного вида микроорганизма условия: t = 30 °C, культивирование без доступа воздуха. Из образовавшегося в образцах равномерного, плотного сгустка без посторонних включений делали высевы и рассевали до единичных колоний на питательной среде агар MRS по микробиологическим разведениям от 1 до 10. Образцы культивировали на чашках Петри в термостате при t = 30 °C, 72 ч. Завершение этапа культивирования оценивали по характерному росту поверхностных колоний на среде. Образцы колоний исследовались методами микроскопии и окраски по Граму.

Для изучения фенотипических свойств выделенных бактерий колонию масштабировали путем засева на питательный бульон MRS. Образцы культивировали в термостате при t = 30 °C, 72 ч. Завершение культивирования оценивали по характерному росту в пробирке с питательным бульоном или образованием осадка бактериальной массы. В образцах питательных бульонов, предварительно засеянных колониями, определяли фенотипические свойства бактериальной клетки. Результаты приведены в таблице.

© М. С. Каночкина, А. Р. Галимова, М. В. Виноградов, 2024

Фенотипические и биохимические свойства выделенных колоний

Номер образца	Культуральные, морфологические, тинкториальные и фенотипические показатели	Биохимические свойства — ферментация углеводов	Технологические свойства — время ферментации до образования плотного, однородного сгустка, ч
1	Грамположительные клетки сферической, реже овальной и вытянутой формы, расположенные в монококках и диплококках, реже в небольших извилистых цепочках по 3–7 звеньев и небольших скоплениях, неподвижны, спор и капсул не образуют	Фруктоза, глюкоза, лактоза, мальтоза, раффиноза, сахароза, трегалоза	6
2		Фруктоза, глюкоза, лактоза, мальтоза, раффиноза, сахароза, манноза, глюконат	7
3		Фруктоза, глюкоза, лактоза, мальтоза, раффиноза, сахароза, трегалоза, галактоза, манноза, декстрин	5

Для оценки биохимических свойств проводился анализ по культивированию бактерий на среде MRS с замещением классического углевода (глюкоза) на другие углеводы. Для визуальной оценки характерного роста (сбраживания углеводов бактериями в процессе ферментации) в питательный субстрат добавлялся индикатор, позволяющий оценить уровень ацидификации. Результаты приведены в таблице.

Результаты

В ходе ферментации свежего молока в оптимальных условиях для роста бактериальных культур *Lactococcus* spp. были выявлены 3 образца сгустков, которые образовались за 5–8 ч, их использовали для дальнейших исследований. Эти данные с технологической точки зрения показывают потенциальную активность микроорганизма в ферментационном цикле.

Заключение

На основании полученных культуральных, морфологических, фенотипических, тинкториальных и биохимических характеристик образцы молочнокислых бактерий отнесены к виду *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Высокие технологические и ферментационные свойства бактериальных культур дают основания для дальнейшего их исследования для применения в качестве заквасочных культур в пищевой промышленности.

Литература

1. Yerlikaya O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of Lactococcus lactis ssp. lactis strains isolated from raw milk and kefir grains. // Dairy Sci. 2019. Vol. 102 (1). P. 124–134.

2. Tian K., Li Y., Wang B. et al. The genome and transcriptome of Lactococcus lactis ssp. lactis F44 and G423: Insights into adaptation to the acidic environment // Dairy Sci. 2019. Vol. 102 (2). P. 1044–1058.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-74

КАМУФЛИРОВАНИЕ АП-КОНВЕРСИОННЫХ НАНОЧАСТИЦ: ВЛИЯНИЕ НА ИНТЕРНАЛИЗАЦИЮ, БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ТОКСИЧНОСТЬ *IN VITRO* И *IN VIVO* *

CAMOUFLAGING UP-CONVERSION NANOPARTICLES: IMPACT ON INTERNALIZATION, BIODISTRIBUTION, AND TOXICITY *IN VITRO* AND *IN VIVO*

И. В. Карандашов[1], С. А. Брезгин[1,2], А. С. Фролова[1], А. С. Тихонов[1], Н. И. Пономарева[1,2], А. П. Костюшева[1,2], В. П. Чуланов[4], Д. С. Костюшев[1–3]

[1]*Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных болезней им. Марциновского Сеченовского университета, Москва*
[2]*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*
[3]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[4]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

I. V. Karandashov[1], S. A. Brezgin[1,2], A. S. Frolova[1], A. S. Tikhonov[1], N. I. Ponomareva[1,2], A. P. Kostyusheva[1,2], V. P. Chulanov[4], D. S. Kostyushev[1–3]

[1]*Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov University, Moscow*
[2]*Sirius University of Science and Technology, Sochi*
[3]*Lomonosov Moscow State University*
[4]*Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ ivan.karandashov@gmail.com

Аннотация

Ап-конверсионные наночастицы обладают свойством поглощать фотоны с низкой энергией и преобразовывать их в испускаемые фотоны с высокой энергией, которые повреждают окружающие клетки. Таким образом, данные частицы могут оказывать противоопухолевое действие. Недостатком ап-конверсионных наночастиц является низкое накопление в опухоли и высокий макрофагальный клиренс. Покрытие наночастиц биокамуфляжем позволит улучшить их биодоступность.

Abstract

Upconversion nanoparticles have the property of absorbing low-energy photons and converting them into emitted high-energy photons, which can damage surrounding cells. Thus, these particles can exhibit anti-tumor effects. A disadvantage of upconversion nanoparticles is their low accumulation in tumors and high macrophage clearance. Coating the nanoparticles with biocamouflage can improve their bioavailability.

Цель исследования — получить биокамуфлированные ап-конверсионные наночастицы, оценить интернализацию, биораспределение и противоопухолевое действие на моделях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Ап-конверсионные наночастицы камуфлировали с помощью клеточных мембран, функционализованных таргетирующими пептидами. Степень камуфлирования наночастиц, модифицированных флуорофором Cy5, оценивали с помощью анализа гашения флуоресценции трипановым синим. Интернализация камуфлированных наночастиц оценивалась с помощью флуоресцентной микроскопии. Цитотоксичность оценивали на клеточных линиях и сингенной мышиной модели меланомы. Биораспределение ап-конверсионных и камуфлированных наночастиц изучали методом ИСП-АЭС.

Результаты. При действии трипанового синего на ап-конверсионные наночастицы, меченые Cy5, флуоресценция снижается на 90 % ($p < 0,05$), в то время как при камуфлировании наночастиц биологическими мембранами уровень флуоресценции не изменяется, что может свидетельствовать о практически полном покрытии наночастиц. Интернализация биокамуфлированных наночастиц в клетки увеличивалась по сравнению с немодифицированными, что свидетельствует об увеличении взаимодействия частиц с клеточной мембраной. Цитотоксичность камуфлированных наночастиц была сопоставима с некамуфлированными при использовании более низких (в 10 раз) концентраций частиц. При системном введении камуфлированных наночастиц с таргетирую-

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 23-75-10025).

© И. В. Карандашов, С. А. Брезгин, А. С. Фролова, А. С. Тихонов, Н. И. Пономарева, А. П. Костюшева, В. П. Чуланов, Д. С. Костюшев, 2024

щим пептидом увеличивалось накопление в целевом органе по данным ИСП-АЭС, в то время как немодифицированные частицы накапливались преимущественно в печени и селезенке. Интратуморальное введение камуфлированных наночастиц и облучение опухоли инфракрасным светом снижало массу опухоли приблизительно на 50 % ($p < 0,05$).

Выводы. Была разработана технология полного камуфлирования неорганических наночастиц на примере ап-конверсионных наночастиц биологическими мембранами; показана возможность изменения биораспределения, таргетной доставки и увеличения биосовместимости неорганических наночастиц с использованием полученной технологии. Камуфлированные наночастицы оказывают выраженное противоопухолевое действие на модели меланомы *in vivo*.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-75

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С КОФЕЙНОЙ КИСЛОТОЙ И ГЛУТАТИОНОМ *

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NANOPARTICLES WITH CAFFEIC ACID AND GLUTATHIONE

О. А. Козлова[1,2], В. А. Щелконогов[1–3], А. М. Иншакова[1], Н. С. Шастина[1], О. А. Баранова[2,3], А. В. Чеканов[2,3], Э. Ю. Соловьева[2], А. И. Федин[2]

[1]МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва
[3]Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Фрязино

O. A. Kozlova[1,2], V. A. Shchelkonogov[1–3], A. M. Inshakova[1], N. S. Shastina[1], O. A. Baranova[2,3], A. V. Chekanov[2,3], E. Y. Solovyova[2], A. I. Fedin[2]

[1]MIREA — Russian Technological University, Moscow
[2]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
[3]Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics RAS, Fryazino

✉ olenkakozl0w4@yandex.ru

Аннотация

Были получены наночастицы (НЧ) с кофейной кислотой (CA), глутатионом (GSH) и их комбинацией с размером частиц 115–200 нм, характеризующиеся медленным высвобождением активных субстанций из липосом (Лс) и высокой коллоидной стабильностью при длительном хранении при Т +4 °С. Степень включения антиоксидантов в липосомах составила 50–75 % для CA и 25–45 % для GSH. Показано, что НЧ, содержащие CA и GSH совместно, обладают наиболее выраженным антиоксидантным действием.

Abstract

Nanoparticles (NPs) with caffeic acid (CA), glutathione (GSH) and their combination with a particle size of 115–200 nm were obtained, characterized by slow release of active substances from liposomes (Lc) and high colloidal stability during long-term storage at T +4 °C. The extenct of inclusion of antioxidants in liposomes was 50–75 % for CA and 25–45 % for GSH. It has been shown that NPs containing CA and GSH together have the most pronounced antioxidant effect.

Цереброваскулярные заболевания являются наиболее распространенными формами патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов. К основным патогенетическим механизмам развития инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов и др. [1]. Поэтому при комплексной терапии данной патологии необходимо применять препараты, проявляющие антиоксидантное и антиагрегантное действие. Одними из перспективных антиоксидантов являются кофейная кислота и глутатион. Однако, попадая в организм, они быстро биодеградирует (под действием разных ферментов или за счет связывания с белками), что приводит к уменьшению терапевтического действия. Период полувыведения GSH — 10 мин.

Поэтому **целью исследования** является получение наночастиц с CA, GSH и их комбинацией для защиты данных антиоксидантов от биодеградации, для медленного высвобождения активных субстанций из липосом), а также исследование их влияния на функциональную активность нейтрофилов.

На первом этапе работы получали липосомы с CA и GSH пассивной загрузкой, диспергируя липидную пленку физиологическим раствором (pH 5,7), содержащим глутатион, с последующей экструзией.

Таким образом были получены фосфатидилхолиновые липосомы с CA, глутатионом (GSH) и их комбинацией с размером частиц от 115 до 200 нм. Эффективность включения антиоксидантов в липосомы составила от 50 ± 5 до 75 ± 5 % для CA и от 25 ± 5 до 45 ± 5 % для GSH. Было показано, что липосомы с CA, GSH и их комбинацией были дисперсионно стабильными при длительном хранении (> 5 мес.) при Т +4 °С. Полученные наночастицы были электронейтральными.

* Исследование выполнено в рамках государственных заданий № 122051600109-5 (РНИМУ им. Н. И. Пирогова) и 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, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, 2024

Далее изучали кинетику высвобождения CA и GSH из липосом. Было показано, что из липосом за 24 ч высвободилось 80 ± 10 % кофейной кислоты и около 80 % глутатиона, что позволяет судить о пролонгированном действии препарата и поддержании его терапевтической концентрации в крови.

Одними из форменных элементов плазмы крови являются нейтрофилы, способные генерировать активные формы кислорода (АФК) в присутствии различных активаторов. В данной работе оценивалось антиоксидантное действие липосом с CA, GSH и их комбинацией на активированных нейтрофилах в сравнении с водными растворами активных субстанций и «пустых» Лс. В качестве активатора нейтрофилов использовали форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА).

Было продемонстрированно, что добавление ФМА к нативным нейтрофилам приводило к увеличению интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции НФ по сравнению с интактными клетками. В свою очередь, добавление наночастиц с CA (0,6–1,1 мМ), GSH (0,2–0,4 мМ) и их комбинацией приводило к уменьшению (5–80 раз) интенсивности хемилюминесценции, обусловленной образованием активных форм кислорода в НФ, активированных с помощью ФМА, по сравнению с нативными клетками. Наиболее выраженным антиоксидантным действием обладали липосомы, содержащие CA и GSH совместно. Водные растворы CA и GSH также проявляли антиоксидантные свойства в выбранной клеточной модели, снижая концентрацию АФК примерно в 3–3,2 раза.

Таким образом, наночастицы с CA, GSH и их комбинацией являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований молекулярно-биологических механизмов *in vivo*.

Литература

1. Shchelkonogov V. A., Inshakova A. M. et al. Nanoparticles of lipoic acid esters: preparation andantioxidant effect // Mend. Commun. 2021. Vol. 31. P. 507508.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-76

УНИКАЛЬНЫЕ УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИЕ БИОПОЛИМЕРЫ МОРСКИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ*

UNIQUE CARBOHYDRATE-CONTAINING BIOPOLYMERS OF MARINE GRAM-NEGATIVE BACTERIA

М. С. Кокоулин, А. С. Кузьмич, А. П. Фильштейн, Л. А. Романенко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

M. S. Kokoulin, A. S. Kuzmich, A. P. Filshtein, L. A. Romanenko

Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok

✉ maxchem@mail.ru

Аннотация

В докладе представлены результаты исследований структур и отдельных биологических свойств углеводсодержащих биополимеров — компонентов клеточной стенки морских грамотрицательных бактерий.

Abstract

The report presents the results of studies of structures and some biological properties of carbohydrate-containing biopolymers — components of the cell wall of marine Gram-negative bacteria.

До недавнего времени почти весь научный и практический интерес был сосредоточен на изучении микроорганизмов, использующих в качестве среды обитания организм млекопитающих и растений, и существенно меньший интерес вызывала группа микроорганизмов, обитающих в иных экологических условиях. Морская среда обитания представляет собой сложную экосистему с огромным разнообразием форм жизни, в том числе значительной долей микроорганизмов. Жизнь на большей части морской среды обитания характеризуется экстремальными абиотическими условиями, включающими высокую соленость, низкую температуру, высокое гидростатическое давление, отсутствие солнечного света и низкое содержание питательных веществ. Морские бактерии используют различные адаптивные стратегии для выживания и размножения в среде обитания, которая является разрушительной для большинства других микроорганизмов, и способность микроорганизмов справляться с экстремальными экологическими стрессами в основном определяется стабильностью их клеточных мембран.

Внешняя мембрана клеточной стенки грамотрицательных бактерий, как правило, состоит из липополисахаридов (ЛПС) — амфифильных макромолекул, закрепленных в фосфолипидном бислое. Структура ЛПС играет важную роль в целостности, гибкости и текучести клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также имеет решающее значение для нормальной физиологии и роста микроорганизмов. Кроме того, некоторые бактерии могут продуцировать внеклеточные полисахариды. Бактериальные внеклеточные полисахариды обычно встречаются в двух формах: в виде капсульных полисахаридов (КПС), если они связаны с клеточной поверхностью, и полисахаридов, высвобождающихся в окружающую среду (экзополисахариды). Присутствие этих биополимеров указывает на их специфические свойства и функции, которые полезны для микроорганизмов; они играют важную роль в защите бактериальной клетки от суровых условий окружающей среды, в поверхностной адгезии, межклеточной трансдукции сигнала и др.

За последние несколько лет нами были выделены, установлены структуры и изучены биологические свойства ЛПС и КПС отдельных представителей морских грамотрицательных бактерий, отнесенных к родам *Cobetia, Kangiella*, *Echinicola, Cellulophaga, Idiomarina* и др. Показано, что некоторые морские грамотрицательные бактерии продуцируют уникальные аминированные и сульфатированные гликополимеры, а также полисахариды с цвиттер-ионной природой, многие из которых проявляют антипролиферативные свойства по отношению к различным линиям опухолевых клеток. Изучены механизмы избирательного антипролиферативного действия полисахаридов из микроорганизмов *K. japonica* КММ 3897 и КММ 3899^{T} в отношении клеток протоковой карциномы молочной железы человека линии T-47D; установлено, что полисахариды индуцируют

* Исследование выполнено при финансовой поддержке стипендией Президента Российской Федерации СП-4729.2022.4 и гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг. (соглашение № 075–15-2021-1052).

© М. С. Кокоулин, А. С. Кузьмич, А. П. Фильштейн, Л. А. Романенко, 2024

арест клеточного цикла и митохондриально-зависимый апоптоз. КПС микроорганизма *C. marina* КММ 3878 селективно индуцировал апоптоз в клетках промиелоцитарной лейкемии человека HL-60, причем были задействованы как внешний, так и внутренний сигнальные пути. Исследованы структуры липидных фрагментов молекул ЛПС из микроорганизмов *Echinicola sp.*, *Cellulophaga sp.*, *I. zobellii* КММ 231^{T} и *K. japonica* КММ 3897. Показано, что молекулы липида А морских бактерий отличаются низкой степенью ацилирования, а также содержат жирные кислоты, не характерные для ЛПС энтеробактерий. Установлено, что некоторые исследованные ЛПС являются слабыми индукторами синтеза провоспалительных цитокинов иммунокомпетентными клетками человека и проявляют антагонистические свойства по отношению к ЛПС микроорганизмов *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*.

Исследование углеводсодержащих биополимеров морских грамотрицательных бактерий, безусловно, является фундаментальной отправной точкой для понимания молекулярных основ, лежащих в основе процессов адаптации, но также чрезвычайно важно в перспективе разработки и реализации новых медицинских и ветеринарных препаратов направленного действия.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-77

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА С ЛЕГОЧНЫМ СУРФАКТАНТОМ

INTERACTION OF LIPOSOMAL FORMS OF LEVOFLOXACIN WITH PULMONARY SURFACTANT

И. М. Колмогоров, В. А. Тимошенко, И. В. Григорян, И. М. Ле-Дейген

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

I. M. Kolmogorov, V. A. Timoshenko, I. V. Grigoryan, I. M. Le-Deygen

Lomonosov Moscow State University

✉ kolmogorov2001@mail.com

Аннотация

Исследовано взаимодействие липосомального левофлоксацина с бычьим легочным сурфактантом. С помощью методов Ленгмюра — Вильгельми, АСМ, ИК- и флуоресцентной микроскопии доказано, что функционализация поверхности липосом маннозилированным хитозаном предотвращает преждевременное слияние везикул с сурфактантом, при этом способствует удержанию формуляции на границе раздела фаз сурфактант — воздух.

Abstract

The interaction between liposomal levofloxacin and bovine pulmonary surfactant was investigated. It has been demonstrated using Langmuir-Wilhelmy techniques, AFM, IR and fluorescence microscopy that functionalizing the surface of liposomes with mannosylated chitosan minimizes the initial fusion of vesicles with surfactant, while also assisting in the retention of the formulation at the surfactant-air interface.

На сегодняшний день как в России, так и в мире остро стоит задача разработки антибактериальных лекарственных препаратов, в том числе для ингаляционного введения. В данной работе предложен подход к исследованию взаимодействия функционализированных липосомальных форм одного из фторхинолонов — левофлоксацина с легочным сурфактантом (ЛС) на основе ИК-микроскопии, атомно-силовой и флуоресцентной микроскопии и исследования поверхностного баланса методом Ленгмюра — Вильгельми.

ЛС выделяли из бычьих легких. Содержание фосфолипидов определяли по качественной реакции с ферротиоционатом аммония: 78 ± 2 %, что хорошо соответствует литературным данным. Для определения числа ненасыщенных связей в липидной составляющей ЛС определили йодное число 205 ± 5.

Дополнительную информацию о пространственном распределении белков и липидов в ЛС получали методом ИК-микроскопии. За распределением компонент следили по характеристическим полосам поглощения

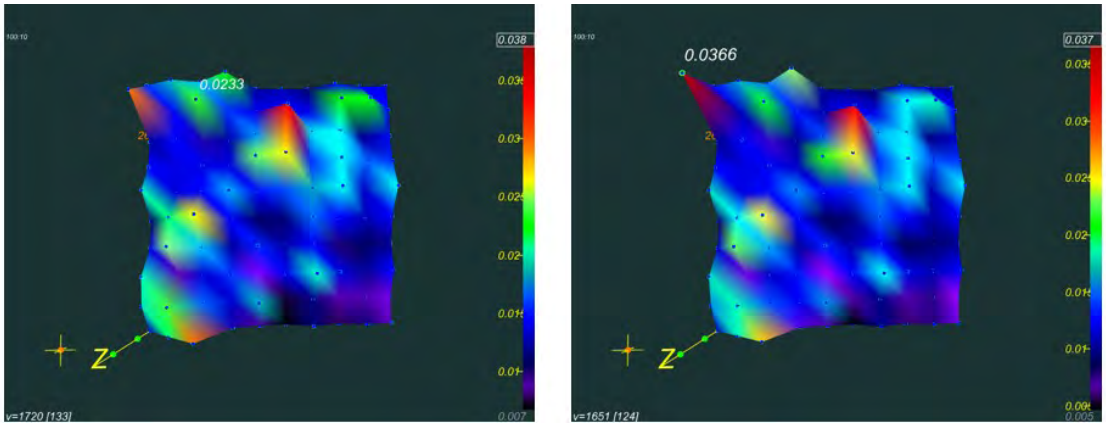


Рис. 1. Распределение сигнала полос поглощения липидов при 1720 см$^{-1}$ (*слева*) и белков при 1651 см$^{-1}$ (*справа*) легочного сурфактанта быка, 25 °С

© И. М. Колмогоров, В. А. Тимошенко, И. В. Григорян, И. М. Ле-Дейген, 2024

для липидов при 1720 $см^{-1}$, соответствующей карбонильной связи, и для белков при 1651 $см^{-1}$, соответствующей полосе поглощения Амид-I. Полученные карты распределения интенсивности сигнала представлены на рис. 1.

Обнаружено, что в ЛС липидная и белковая компоненты ко-локализованы, таким образом, при взаимодействии с ЛС взаимодействия с липидной и белковой фракцией стоит рассматривать в совокупности, а не по отдельности.

Взаимодействие липосомальных форм левофлоксацина с ЛС исследовали методом Ленгмюра — Вильгельми. В типичном эксперименте образец исследуемого вещества наносится на ванну большой площади, далее сближают подвижные барьеры и следят за изменением двумерного давления. Сравнивали ход изотерм сжатия для образцов ЛС, ЛС с добавлением липосом из дипальмитоилхолинфосфатидилхолина и кардиолипина в массовом соотношении 80 : 20 (ДПФХ : КЛ) и ЛС с добавлением липосом ДПФХ : КЛ, покрытых Хитозан-маннозой (Хитман).

При сравнении систем ЛС/ЛС с липосомами наблюдали изменение хода изотермы сжатия (рис. 2, *А*), свидетельствующее о появлении рафтов слияния. Для покрытых полимером липосом (рис. 2, *Б*) введение полимера приводило к уменьшению роста двумерного давления при наложении нагрузки. Это свидетельствует об отсутствии слияния липосомальной мембраны с монослоем ЛС, при этом покрытие липосом Хитманом позволяет системе быть стабильной при уменьшении межмолекулярного расстоянии.

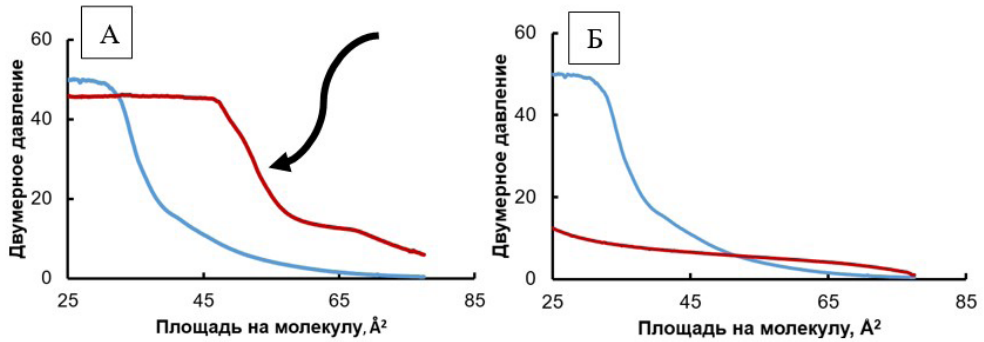


Рис. 2. Изотерма сжатия для образца ЛС (*голубой*) и при добавлении ДПФХ : КЛ липосом (*красный*) без полимера (*А*) и с полимером (*Б*), 25 °С. Стрелкой указан участок, характерный для процесса слияния мембраны липосом с ЛС

Полученный образец монослоя на слюде помещали на атомно-силовой микроскоп (АСМ) и получали различные изображения монослоя. На рис. 3, *А* представлены отдельные островки, которые соответствуют ЛС и совпадают по природе с данными из литературы (рис. 3, *Б*) [1].

При исследовании образца с липосомами обнаружены яркие глобулы большой высоты, которые соответствуют липосомам (рис. 4, *А*). Они интернализировались в монослой, «достраивая» его, при этом липосомы были связаны с поверхностью ЛС. Иная картина наблюдалась для покрытых полимером липосом (рис. 4, *Б*). Липосомы также наблюдались в монослое ЛС, однако вместо интернализации они занимали положение исключительно на границе раздела фаз слюда — сурфактант.

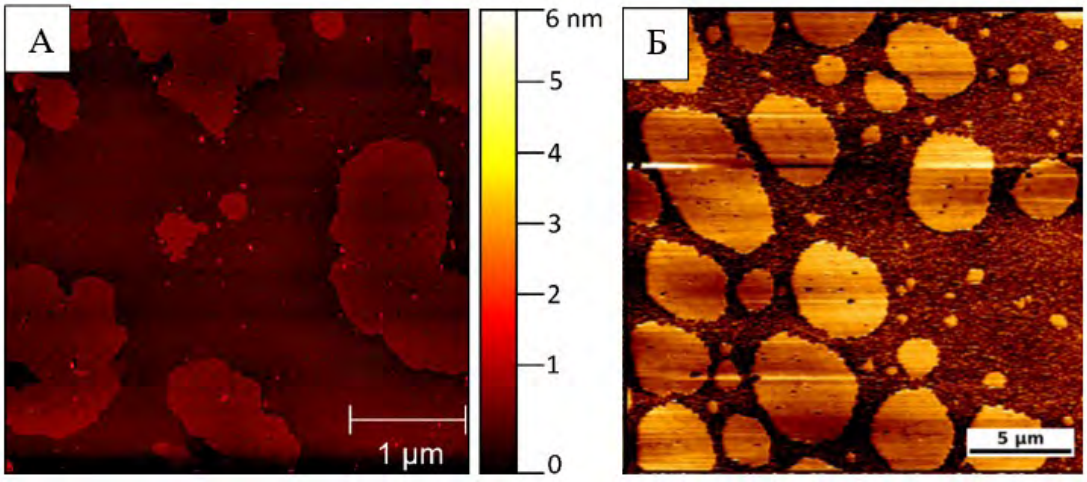


Рис. 3. Изображение, полученное на АСМ при исследовании ЛС в нашей работе (*А*) и в литературе (*Б*)

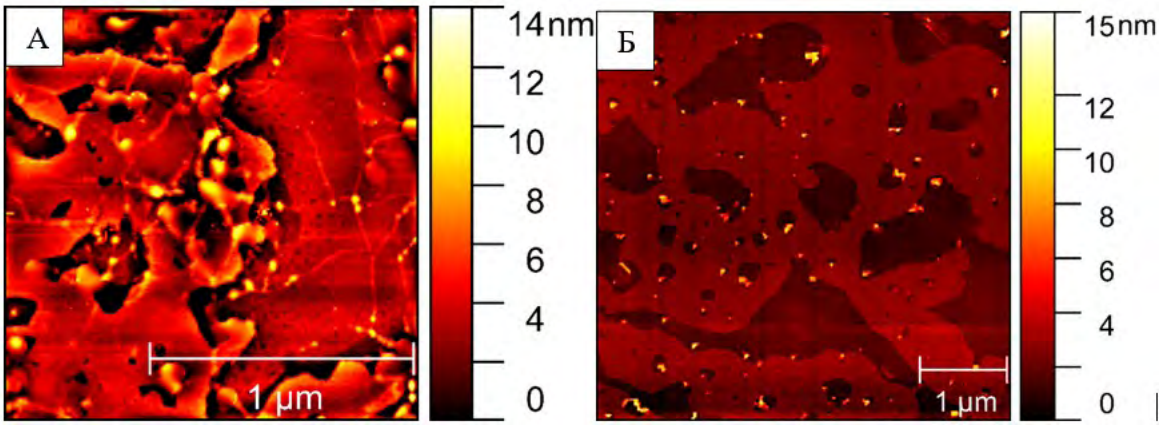


Рис. 4. Изображение, полученное на АСМ при добавлении ДПФХ : КЛ липосом без полимера (*А*) и с полимером (*Б*) на ЛС

Для исследования характера массопереноса при слиянии липосом с ЛС был применен метод флуоресцентной микроскопии. На слой ЛС на водной субфазе наносили флуоресцентно-меченые липосомы. Для образца липосом, не покрытых Хитманом, наблюдается равномерное распределение сигнала (рис. 5, *А*), что свидетельствует о быстром распределении меченного липида в монослое. Иная картина наблюдается для липосом, покрытых Хитманом (рис. 5, *Б*). На снимке видны очаги флюоресценции, которые отличаются по размеру и интенсивности, что говорит о неравномерности и низкой скорости массопереноса.

Полученные данные могут лечь в основу разработки ингаляционного антибактериального препарата для борьбы с тяжелыми инфекциями с улучшенными биофармацевтическими свойствами.

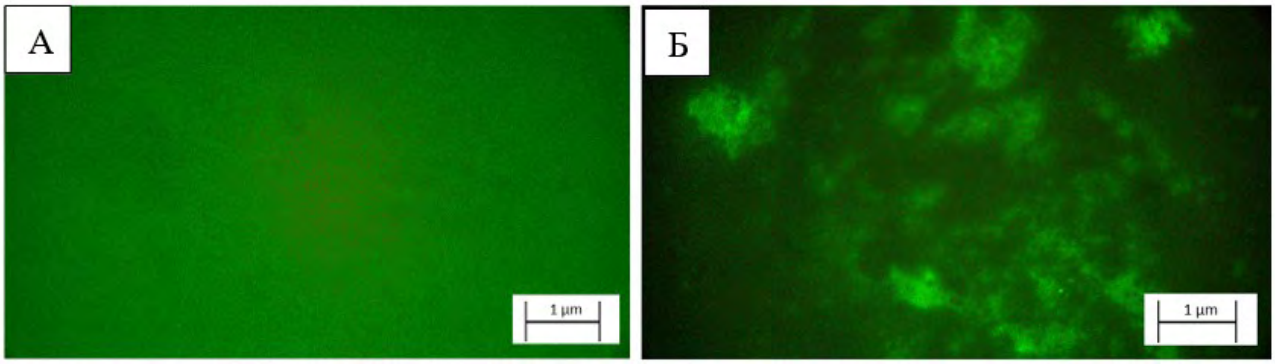


Рис. 5. Распределение флюоресценции для липосом ДПФХ : КЛ без полимера (*А*) и с полимером (*Б*), нанесенных на монослой ЛС

Литература

1. Liekkinen J. et al. Surfactant Proteins SP-B and SP-C in Pulmonary Surfactant Monolayers: Physical Properties Controlled by Specific Protein-Lipid Interactions // Langmuir. 2023. Vol. 39, No. 12. P. 4338–4350.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-78

ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗАТОРОВ НА СОХРАННОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ГЕПАТИТА В

THE INFLUENCE OF STABILIZERS ON THE POTENCY OF A REFERENCE STANDARD OF HUMAN HEPATITIS B IMMUNOGLOBULIN

Е. А. Коновалова, Е. Н. Калинина, Е. В. Росина, С. Е. Зиганшина, Е. С. Кормщикова

Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства

E. A. Konovalova, E. N. Kalinina, E. V. Rosina, S.E.Ziganshina, E. S. Kormschikova

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion under the Federal Medical and Biological Agency

✉ konovalovaea@niigpk.ru

Аннотация

Для создания национального (фармакопейного) стандартного образца важное значение имеет разработка способа стабилизации антител. Его эффективность зависит от компонентного состава защитной среды. В данном исследовании проведен анализ влияния стабилизаторов на сохранность специфической активности иммуноглобулина человека против гепатита В.

Abstract

The development of a method for stabilizing antibodies is important for obtaining a national (pharmacopoeial) standard. Its effectiveness depends on its stabilizing formulation. This study analyzed of the influence of stabilizers on the potency of a reference standard of human hepatitis B immunoglobulin.

Введение

Специфическую активность иммуноглобулина человека против гепатита В (ИГЧГВ) оценивают по отношению к стандартному образцу (СО), аттестованному в международных единицах (МЕ) [1–4]. Существующий международный СО не доступен российским фармпроизводителям, а национальный — отсутствует [5]. Для его разработки необходима технология производства, в том числе способ стабилизации антител. Основным требованием, предъявляемым к СО, является постоянство специфической активности в течение всего срока хранения [6]. Использование стабилизаторов позволяет полноценно сохранить структуру белковых молекул и их функциональную активность в процессе изготовления и хранения. Эффективность защитной среды зависит от ее состава.

Цель исследования — оценить влияние стабилизаторов на сохранность специфической активности стандартного образца иммуноглобулина человека против гепатита В.

Материалы и методы

1. Исследовали лиофилизированные концентраты ИГЧГВ, стабилизированные глицином, L-пролином, трегалозой, бычьим сывороточным альбумином (БСА).

2. Для оценки влияния состава стабилизаторов на сохранность специфической активности исследованных образцов использовали метод ускоренного старения в течение 28 суток при температуре 52 °С.

3. Специфическую активность определяли методом иммуноферментного анализа с применением набора реагентов ВектоHBsAg-антитела (АО «Вектор-Бест», Россия).

4. Рассчитывали среднее арифметическое значение и стандартное отклонение. Значимость различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты

Установлено, что на 28-е сутки испытаний по ускоренному старению при температуре 52 °С специфическая активность лиофилизированного концентрата ИГЧГВ значимо снизилась (p = 0,01) на 17 % только в случае стабилизации антителглицином в концентрации 22,5 г/л при значении pH 5,3. Результаты испытаний по ускоренному старению представлены в таблице.

© Е. А. Коновалова, Е. Н. Калинина, Е. В. Росина, С. Е. Зиганшина, Е. С. Кормщикова, 2024

Результаты испытаний по ускоренному старению лиофилизированного концентрата иммуноглобулина человека против гепатита В

Показатель качества	Состав стабилизирующей среды				
	Глицин 22,5 г/л (pH 6,8)	**Глицин 22,5 г/л (pH 5,3)**	**L-пролин 25 г/л (pH 5,2)**	**Трегалоза 40 г/л (pH 5,2)**	**Трегалоза 40 г/л + БСА 2 г/л (pH 5,1)**
Специфическая активность, МЕ/мл (в первые и на 28-е сутки)	45,2 ± 1,9 / 43,0 ± 1,1 (p = 0,25)	49,4 ± 1,0 / 40,8 ± 0,6 (p = 0,01)	46,0 ± 4,0 / 44,8 ± 0,9 (p = 0,41)	43,1 ± 3,0 / 43,9 ± 2,7 (p = 0,75)	46,2 ± 1,1 / 44,7 ± 0,6 (p = 0,75)

Полученные данные могут свидетельствовать о высоких протективных свойствах стабилизаторов на основе глицина (22,5 г/л, pH 6,8), *L*-пролина (25 г/л, pH 5,2), трегалозы (40 г/л, pH 5,2), трегалозы (40 г/л) с добавлением БСА (2 г/л) при pH 5,1. Считается, что антитела более стабильны при слабокислых pH. Однако в данном исследовании образец с нейтральным pH показал лучшую сохранность антител, что требует дальнейшего изучения.

Заключение

Продолжение испытаний стабильности позволит выбрать оптимальный компонентный состав защитной среды для СО ИГЧГВ, обеспечивающий постоянство его специфической активности.

Литература

1. Корнилова О. Г., Кривых М. А., Волкова Р. А. и др. Стандартные образцы в оценке специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов и альбумина человека: особенности разработки, аттестации и применении // Стандартные образцы. 2018. № 3–4. С. 33–41.

2. ОФС.1.1.0007. Стандартные образцы. Государственная фармакопея Российской Федерации. 2024. XV изд. Т. 1.

3. ФС.3.3.2.00012.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутримышечного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. 2018. XIV изд. Т. 4.

4. ФС.3.3.2.00011.18 Иммуноглобулин человека против гепатита В для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. 2018. XIV изд. Т. 4.

5. WHO International Standard. Second International Standard for anti-hepatitis B surface antigen (anti-HBs) immunoglobulin, human NIBSC code: 07/164 Instructions for use. URL: https://nibsc.org/documents/ifu/07-164.pdf

6. ГОСТ 8.315-2019 Государственная система обеспечения единства измерений. Стандартные образцы состава и свойств веществ и материалов. Основные положения. М.: Стандартинформ, 2019. 33 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-79

ПОЛУЧЕНИЕ БИОСИЛИКОНА НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА

PREPARATION OF GELATIN-BASED BIOSILICONE

С. В. Кравченко

Кубанский государственный технологический университет, Краснодар
Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Краснодар

S. V. Kravchenko

Kuban State Technological University, Krasnodar
Trubilin Kuban State Agrarian University, Krasnodar

✉ ksv.1991@yandex.ru

Аннотация

В данной работе удалось отработать методику получения биосиликона на основе желатина, обладающего прочностью и эластичностью, позволяющей выполнять растяжение и иные изменения формы изготовленных из него структур. В отличие от синтетических полимеров, материалы на основе желатина в большей степени биосовместимы и способны к биодеградации.

Abstract

In this work, it was possible to practice with method for obtaining gelatin-based biosilicone, which has strength and elasticity, allowing stretching and other changes in the shape of structures made from it. Unlike synthetic polymers, materials based on gelatin more biocompatible and biodegradable.

Мягкие робототехнические системы обладают большим потенциалом ввиду своей высокой степени адаптивности. Чаще всего в сфере мягкой робототехники применяются синтетические полимеры, которые удобны в обработке и использовании, однако не обладают способностью к биодеградации, вследствие чего утерянные роботы и их части могут приводить к загрязнению окружающей среды [1]. К тому же данные материалы не всегда могут отличаться высокой степенью биосовместимости, что может иметь значение при разработке роботов и устройств медицинского назначения, а также гибридных биоробототехнических систем, имеющих в себе биологические компоненты, например мышечную ткань в качестве актуаторов [2]. Решением данных проблем может стать использование эластичных материалов, полученных на основе веществ биологического происхождения, например желатина, на основе которого может быть получен биосиликон, обладающий механическими свойствами, близкими к свойствам синтетических полимеров, однако обладающего способностью к биодеградации [3, 4].

Цель исследования — отработка в условиях лаборатории протокола получения биосиликона на основе желатина.

В качестве основы использовался желатин типа А, прочностью 220 блум (Россия). Для получения жидкого биосиликона желатин растворялся в дистиллированной воде с добавлением глицерина таким образом, чтобы пропорциональное соотношение желатин : вода : глицерин в итоговом растворе было 2 : 8 : 1. Раствор выдерживался в термостате при +80 °С 1,5 ч, после чего разливался в формы и охлаждался при комнатной температуре +22 °С 12 ч. По прошествии 12 ч образцы биосиликона в виде плоских пленок толщиной 1 мм извлекались из форм, из них нарезались полоски шириной 20 мм и длиной 40 мм. Полученные образцы материала подвергались растяжению в 1,5 раза от исходной длины, оценивалась способность испытывать данное растяжение без разрыва и возвращать исходную длину. Образцы, подвергнутые растяжению сразу после 12-часового выдерживания, демонстрировали разрывы при многократном растяжении, в то время как образцы с выдержкой около 2 суток были устойчивы к многократному растяжению в 1,5 раза от исходной длины.

Таким образом, в ходе проведенной работы удалось отработать методику получения биосиликона, обладающего прочностью и эластичностью, позволяющей выполнять растяжение и иные изменения формы изготовленных из него структур. В настоящее время ведется работа над подбором оптимального состава биосиликона

© С. В. Кравченко, 2024

и оценкой его механических свойств. Результаты этой работы могут быть востребованы при разработке биосовместимых и биоразлагаемых актуаторов и сенсоров для медицинских и сельскохозяйственных роботов, носимых устройств и систем непрерывного мониторинга.

Литература

1. Kanno R. et al. Biodegradable electrohydraulic soft actuators // Adv. Intell. Syst. 2023. Vol. 5, No. 9. P. 2200239.

2. Duffy R. M., Feinberg A. W. Engineered skeletal muscle tissue for soft robotics: fabrication strategies, current applications, and future challenges // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2014. Vol. 6, No. 2. P. 178–195.

3. Shintake J. et al. Soft pneumatic gelatin actuator for edible robotics // 2017 IEEE/RSJ Int. Conf. Intell. Robots Syst. (IROS). IEEE. 2017. P. 6221–6226.

4. Edward S., Golecki H. M. Gelatin Soft Actuators: Benefits and Opportunities // Actuators. MDPI. 2023. Vol. 12, No. 2. P. 63.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-80

ПОСТРОЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕРЕВА БАКТЕРИИ *BREVIBACILLUS FORMOSUS* DSM 9885 И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

CONSTRUCTION OF A PHYLOGENETIC TREE OF THE BACTERIUM *BREVIBACILLUS FORMOSUS* DSM 9885 AND PROSPECTS FOR ITS APPLICATION IN BIOTECHNOLOGY

А. А. Кузьмицкая, С. В. Калёнов

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

A. A. Kuzmitskaya, S. V. Kalyonov

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

✉ kuzmichwolf@gmail.com

Аннотация

Бактерии рода *Brevibacillus* (семейство *Paenibacillaceae*) представляют большой интерес для специалистов в области микробиологии и биотехнологии, так как обладают значительным потенциалом применения в качестве средств биологической защиты растений, средств для биоремедиации почв, а также в качестве эффективных инструментов для гетерологичной экспрессии генов. В данной работе было построено филогенетическое дерево бактерии *Brevibacillus formosus* DSM 9885, выделенной из образцов почвенных отложений.

Abstract

Bacteria of the genus *Brevibacillus* (family *Paenibacillaceae*) are of great interest to specialists in the field of microbiology and biotechnology, as they have significant potential for use as biological plant protection agents, soil bioremediation agents, and as effective tools for heterologous gene expression. In this work a phylogenetic tree of the bacterium *Brevibacillus formosus* DSM 9885, isolated from soil sediment samples, has been built.

В ходе скрининга образцов почвенных отложений была выделена культура грамположительных аэробных палочковидных бактерий, образующих бежевые, плоские колонии, способная к росту на твердом питательном субстрате, содержащем агар-агар в качестве основного источника углерода. По результатам секвенирования фрагментов гена 16S рРНК выделенная культура была идентифицирована как *Brevibacillus formosus* DSM 9885.

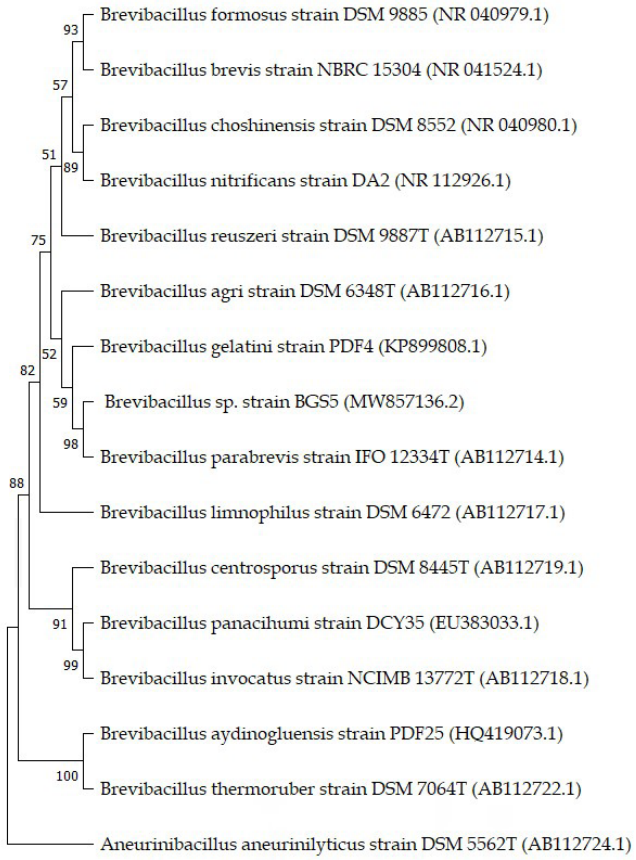
Штаммы *B. formosus* обладают большим ферментативным потенциалом для применения в различных сферах биотехнологии. Например, штамм *B. formosus* BISR-1, выделенный из почв Великой индийской пустыни, может продуцировать гипертермостабильную хитиназу, период полураспада которой составляет свыше 5 ч при температуре 100 °C и которая обладает активностью против различных фитопатогенных грибов [1].

Методом *Neighbor-joining* (методом объединения соседей) было построено филогенетическое дерево (см. рисунок), реконструированное на основе множественного выравнивания последовательностей гена 16S рРНК, показывающее положение *Brevibacillus formosus* DSM 9885 среди родственных таксонов (*Aneurinibacillus aneurin ilyticus* выбран в качестве аут-группы).

Сестринским таксоном для *Brevibacillus formosus* DSM 9885 является *Brevibacillus brevis* NBRC 15304 (см. рисунок). Известно, что эти штаммы бактерий оказывают значительный ингибирующий эффект на развитие мицелия и прорастание спор гриба *Alternaria alternata* (возбудителя заболевания бурой пятнистости листьев картофеля). Согласно опубликованным данным, наибольшего снижения уровня заболеваемости среди картофеля возможно достичь, если опрыскивать растения препаратом, объединяющим оба бактериальных штамма. То есть применение штаммов *B. formosus* DSM 9885 и *B. brevis* NBRC 15304 можно рассматривать в качестве потенциального инструмента для снижения негативного воздействия *A. alternata*, вызывающего бурую пятнистость листьев картофеля [2].

Бактерии *Brevibacillus formosus* DSM 9885 обладают генами, участвующими в ответе на экологический стресс различного происхождения, и способны адаптироваться к меняющимся условиям внешней среды, что обуславливает необходимость их дальнейшего изучения.

© А. А. Кузьмицкая, С. В. Калёнов, 2024



Филогенетическое дерево, построенное методом NJ на основе последовательностей гена 16S рРНК бактерий рода *Brevibacillus*; числа возле узлов обозначают процент надежности топологии, полученный в результате бутстреп-анализа (из 1000 бутстреп-повторов)

Литература

1. Meena S. et al. Production and purification of a hyperthermostable chitinase from *Brevibacillus formosus* BISR-1 isolated from the Great Indian Desert soils // Extremophiles. 2014. Vol. 18. P. 451–462.

2. Ahmed A. I. S. Biological control of potato brown leaf spot disease caused by *Alternaria alternata* using *Brevibacillus formosus* strain DSM 9885 and *Brevibacillus brevis* strain NBRC 15304 // J. Plant Pathol. Microbiol. 2017. Vol. 8, No. 6. P. 1–8.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-81

ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИТОСТЕРИНОВ ЭКСТРАКТОВ ВАСИЛЬКА ШЕРОХОВАТОГО (*CENTAUREA SCABIOSA* L.)

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS OF PHYTOSTEROLS EXTRACTED FROM *CENTAUREA SCABIOSA* L.

Т. П. Кукина[1], И. А. Елшин[1], Е. А. Колосова[2], П. В. Колосов[2], Д. Н. Щербаков[1,2], М. И. Чуркин[2]

[1]*Новосибирский институт органической химии СО РАН им. Н. Н. Ворожцова*
[2]*Алтайский государственный университет, Барнаул*

T. P. Kukina[1], I. A. Elshin[1], E. A. Kolosova[2], P. V. Kolosov[2], D. N. Shcherbakov[1,2], M. I. Churkin[2]

[1]*Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Altai State University, Barnaul*

✉ mad_max99@icloud.com

Аннотация

Василек шероховатый (*Centaurea scabiosa* L.) содержит в своем составе большое количество биологически активных веществ, в том числе фитостерины, обладающие широким спектром биологической активности. В результате исследования получены экстракты из корней, соцветий и листьев в гексане и метилтрет-бутиловом эфире. Методом хромато-масс-спектрометрии в исследуемых экстрактах было идентифицировано 29 биологически активных фитостерина (16 уникальных).

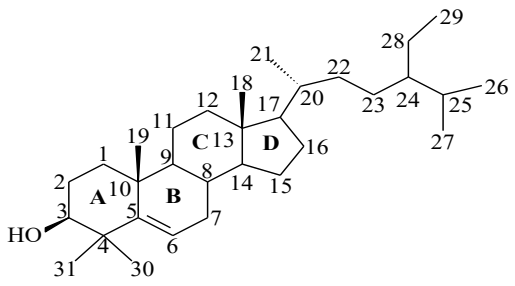
Abstract

Cornflower (*Centaurea scabiosa L.*) contains a large number of biologically active substances, including phytosterols, which have a wide range of biological activity. As a result of the study, extracts were obtained from roots, inflorescences and leaves in hexane and methyl tert-butyl ether. Using the chromatograph mass spectrometry method, 29 biologically active phytosterols (16 unique) were identified in the studied extracts.

Василек шероховатый применяется в народной медицине при болезнях печени, желтухе, в качестве обезболивающего средства. Экстракты василька шероховатого обладают противосудорожными, противопаразитарными, антиоксидантными свойствами. Это растение является перспективным объектом для введения в официальную медицину. В нем обнаружены флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, фенолокислоты, дубильные вещества, кумарины, полисахариды, сесквитерпеновые лактоны, аскорбиновая кислота, каротиноиды и аминокислоты, однако не найдены алкалоиды, иридоиды и экдистероиды. Одной из групп биологически активных веществ являются фитостерины (см. рисунок). Эта группа веществ василька шероховатого описана недостаточно полно [1, 2], следовательно, требуется более глубокое изучение данного вопроса.

Растительный материал был собран на территории Косихинского района Алтайского края. Сбор был проведен в фазу цветения *Centaurea scabiosa L.* Собирались только целые, здоровые, неповрежденные растения. После сбора и очистки растительное сырье подвергалось процессу сушки воздушно-теневым способом.

Экстракцию компонентов растительного сырья проводили с использованием гексана и метилтрет-бутилового эфира (МТБЭ), обеспечивающих высокую степень извлечения липофильных компонентов растительного сырья, в том числе — фитостеринов. Для этого высушенную и измельченную навеску растительного сырья помещали в аппарат Сокслета и экстрагировали в течение 24 ч. После использовали ротационный испаритель. В ходе эксперимента проводили водно-щелочную и водно-спиртово-щелочную экстракцию, после которых полученные вещества растворяли в диэтиловом эфире и очищали методом тонкослойной хроматографии. Анализ данных фракций проводили методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС).



Общая структура фитостеринов [3]

В результате исследования МТБЭ и гексанового экстракта корней василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.) методом ХМС во фракции фитостеринов идентифицировано

©Т. П. Кукина, И. А. Елшин, Е. А. Колосова, П. В. Колосов, Д. Н. Щербаков, М. И. Чуркин, 2024

13 соединений: β-ситостерол, 2,4-метилен-циклоартанол, фукостерол, кампестерол, обтусифолиол, холестерол, стигмастерол, циклоартенол, 4-метил-холест-7-ен-3-ол, цитростадиенол, 9,19-циклоланост-23-ен-3,25-диол и его изомер, стигмаст-7-ен-3-ол.

Основные компоненты фракций: β-ситостерол (58,7 *мг/100г сырья* в экстракте гексана и 67,3 *мг/100г сырья* в экстракте МТБЭ) и циклоартенол (51,4 и 56,3 *мг/100г сырья* соответственно). Кроме того, в МТБЭ экстракте был обнаружен 4-метил-холест-7-ен-3-ол, который не был выявлен в гексановом экстракте.

Во фракции экстрактов соцветий идентифицировано 9 соединений: β-ситостерол, фукостерол, кампестерол, холестерол, ланостерол, стигмастерол, стигмаст-7-ен-3-ол, эргостанол и 9,19-циклоланост-23-ен-3,25-диол.

Основные компоненты: β-ситостерол (126,52 (гексан) и 137,67 (МТБЭ) *мг/100г сырья* соответственно), кампестерол (19,77 и 23,02 *мг/100г сырья* соответственно) и стигмастерол (85,74 и 88,73 *мг/100г сырья* соответственно). Кроме того, в МТБЭ экстракте был обнаружен 9,19-циклоланост-23-ен-3,25-диол, который не был выявлен в гексановом экстракте.

Во фракции экстрактов листьев идентифицировано 7 соединений: β-ситостерол, кампестерол, холестерол, стигмастерол, спинастерол, стигмаст-7-ен-3-ол и эргостанол.

Основные компоненты: β-ситостерол (49,23 (гексан) и 55,47 (МТБЭ) *мг/100г сырья* соответственно) и стигмастерол (33,64 и 88,73 *мг/100г сырья* соответственно). Кроме того, в МТБЭ экстракте были обнаружены холестерол и спинастерол. Эти вещества не выявлены в гексановом экстракте. Вещества более разнообразны, и их концентрация в большинстве случаев превышает концентрацию органических веществ, выделенных из гексанового экстракта листьев василька шероховатого.

Исходя из полученных данных, можем сказать, что в составе василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.) наиболее часто встречаются 5 фитостеринов: β-ситостерол, циклоартенол, кампестерол, холестерол, стигмастерол. Наибольшее их количество содержится в соцветиях; концентрация в МТБЭ экстрактах больше, чем в гексановых.

Литература

1. Marwa A.A. Fayed et al. Sterols from Centaurea pumilio L. with cell proliferative activity: In vitro and in silico studies // Open Chem. 2023. Vol. 21, No. 1. P. 20220316.

2. Badaoui M.I. et al. Chemical Chemical constituents of Centaurea dissecta Ten. and sesquiterpenes chemotaxonomic significance // Biochem. Syst. Ecol. 2024. Vol. 114. P. 104808.

3. Piironen V. et al. Plant sterol: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition // J. Sci. Food Agric. 200. Vol. 80. P. 939–966.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-82

РЕДОКС-АКТИВНЫЙ ПОЛИМЕР «БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН — САФРАНИН», ПРИМЕНЯЕМЫЙ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛА И МОЧЕВИНЫ*

REDOX-ACTIVE POLYMER "BOVINE SERUM ALBUMIN — SAFRANIN", USED AS THE BASIS OF A BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF PHENOL AND UREA

Т. В. Лаврова, А. С. Харькова

Тульский государственный университет

T. V. Lavrova, A. S. Kharkova

Tula State University

✉ lavrova0000@yandex.ru

Аннотация

В работе предлагается использование редокс-активного полимера «бычий сывороточный альбумин — сафранин» при создании биосенсоров на определение фенола и мочевины. Биосенсор на основе тирозиназы имеет диапазон определяемых концентраций 47–600 мг/дм^3. Уреазный биосенсор показал хорошие результаты: диапазон определяемых концентраций составил 68–410 ммоль/дм^3, что позволяет использовать данную систему для контроля содержания мочевины.

Abstract

The work proposes the use of the redox-active polymer "bovine serum albumin — safranin" in the creation of biosensors for the determination of phenol and urea. The biosensor based on tyrosinase has a detectable concentration range of 47–600 mg/dm^3. The urease biosensor showed good results: the range of detected concentrations was 68–410 mmol/dm^3, which allows the use of this system for monitoring the urea.

На сегодняшний день существует потребность в оперативном анализе различных компонентов окружающей среды. В связи с этим разрабатываются биосенсоры, способные быстро и количественно определять концентрации тех или иных компонентов в пробе. Такие датчики могут состоять из электрохимического преобразователя и фермента. Ферменты обеспечивают высокую селективность анализа, но из-за сложности и высокой стоимости выделения и очистки необходимо совершенствовать способы иммобилизации, позволяющие сохранять активность биокомпонента и обеспечивать высокий срок эксплуатации тест-систем. В данном исследовании предлагается использование редокс-активного полимера для иммобилизации двух ферментов: тирозиназы и уреазы.

Бычий сывороточный альбумин (БСА) выбран в качестве полимерной основы матрицы, так как он обладает высокой биосовместимостью, содержит много функциональных групп для модификации редокс-частицами. В работе [1] редокс-активный полимер на основе ферроценкарбальдегида и БСА использовался в качестве основы для определения БПК. При выборе редокс-частиц для получения матриц для иммобилизации необходимо учитывать устойчивость соединения в окисленной и восстановленной формах, отсутствие снижения активности фермента. Данным условиям соответствует сафранин — электроактивное соединение из класса азиновых красителей.

Для обеспечения высокой селективности при количественном определении компонентов в пробах применяют различные ферменты в качестве биоматериала биосенсора. Например, для определения фенольных токсикантов принято использовать тирозиназу, лакказу [2, 3]. В случае анализа биологических жидкостей для определения глюкозы применяют глюкозоксидазу, для анализа концентрации мочевины — уреазу.

Целью работы является синтез универсального редокс-активного полимера БСА-сафранин для иммобилизации ферментов тирозиназы и уреазы.

Для синтеза матрицы бычий сывороточный альбумин растворяли в буферном растворе с pH = 6,8 (33 мМ KH_2PO_4 + 33 мМ Na_2HPO_4), добавляли насыщенный раствор медиатора сафранина О и перемешивали в течение 5 мин. После этого прибавляли глутаровый альдегид и 10 мкл смеси наносили на электрод. Рабочий графито-пастовый электрод состоял из пластиковой трубки, заполненной пастой, состоящей из графитовой пудры и мине-

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 23-73-01220)

© Т. В. Лаврова, А. С. Харькова, 2024

рального масла. После нанесения и подсыхания редокс-активного полимера и раствора фермента закрывали электрод диализной мембраной, закрепляли пластиковым кольцом. Для приготовления раствора тирозиназы 0,0001 г растворяли в 80 мкл буферного раствора. Отдельно был приготовлен раствор уреазы — в 20 мкл буферного раствора растворяли 0,0001 г фермента.

Измерения проводили с помощью гальванопотенциостата Corrtest, используя двухэлектродную ячейку. Графито-пастовый электрод с иммобилизованным ферментом использовали в качестве рабочего. В качестве электрода сравнения использовали насыщенный хлоридсеребряный электрод. Измерения проводили при температуре 20 °C в калий-натрий фосфатном буфере (pH = 6,8). За ответ принимали изменение силы тока при введении раствора анализируемого вещества. Тирозиназа катализирует реакцию окисления фенола, электроны поступают на редокс-активный полимер, а затем на электрод. В случае анализа мочевины уреаза катализирует ее гидролиз, после чего один из продуктов реакции — аммиак — окисляется на электроде при приложенном потенциале до азота.

Нижняя граница определяемых концентраций для биосенсора на определение мочевины составила 68 ммоль/дм^3, а верхняя — 410 ммоль/дм^3. В моче здорового человека концентрация мочевины варьируется в пределах от 110 до 390 ммоль/дм^3 [4]. Следовательно, диапазон определяемых концентраций позволяет использовать рецепторную систему на основе уреазы для контроля концентрации карбамида в моче. Для биосенсора на определение фенола константа Михаэлиса составила 600 ± 200 мг/дм^3, нижняя граница определяемых концентраций — 47 мг/дм^3. Можно предложить использование данной системы для анализа сточных вод, где значение концентрации фенола превышает нижнюю границу определяемых содержаний.

Литература

1. Arlyapov V.A., Kharkova A.S., Kurbanaliyeva S.K. et al. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor // Enzyme and microbial technology. 2021. Vol. 143. P. 109706.

2. Bounegru A.V., Apetrei C. Tyrosinase Immobilization Strategies for the Development of Electrochemical Biosensors — A Review // Nanomaterials. 2023. Vol. 13, No. 4. P. 760.

3. Tarasov A. et al. Biosensors Based on Phenol Oxidases (Laccase, Tyrosinase, and Their Mixture) for Estimating the Total Phenolic Index in Food-Related Samples // Life. 2023. Vol. 13, No. 2. P. 291.

4. Савинова А.А., Нога В.И. Биохимическое исследование крови // Научный потенциал молодежных исследований. 2021. С. 162–165.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-83

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ КАК ПОРООБРАЗУЮЩЕГО АГЕНТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ СИЛАНОВЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И ОКТЕНИДИНА ДИГИДРОХЛОРИДА *

THE USE OF BACTERIAL CELLS AS A PORE-FORMING AGENT FOR THE CREATION OF ANTIBACTERIAL MATERIALS BASED ON SILANE PRECURSORS AND OCTENIDINE DIHYDROCHLORIDE

Е. А. Ланцова

Тульский государственный университет

E.A. Lantsova

Tula State University

✉ e.a.lantsova@tsu.tula.ru

Аннотация

Одной из мировых проблем является рост резистентности бактерий. Перспективной стратегией борьбы является использование материалов с высвобождающимся антибактериальным веществом. Сформированы материалы с использованием клеток *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302 для создания пор, для формирования матрицы использованы тетраэтоксисилан и метилтриэтоксисилан в соотношении 50/50, в качестве антибактериального агента использован октенидин дигидрохлорид.

Abstract

One of the world's problems is the increase in bacterial resistance. A promising control strategy is the use of materials with a released antibacterial substance. Materials were formed using *Paracoccus yeei* BKM B-3302 cells to create pores, tetraethoxysilane and methyltriethoxysilane in a 50/50 ratio were used to form the matrix, and octenidine dihydrochloride was used as an antibacterial agent.

Одной из мировых проблем является рост резистентности микроорганизмов к антибактериальным средствам [1]. Бактерии становятся причинами возникновения инфекций, вызывают потери в экономике. При недостаточном действии антибактериальных средств выживают бактерии, которые передают гены резистентности. Для увеличения эффективности обработки используют большие объемы антисептиков, что приводит к попаданию биоцида в окружающую среду и ее загрязнению [2].

Решением этих проблем может стать создание гибридного антибактериального материала, состоящего из материала-основы и биоцида. При использовании силановых прекурсоров возможно получать мезопористые матрицы, в которые может быть иммобилизован эффективный антисептик. Для получения материала с настраиваемым размером пор применяют метод темплатов [3] с использованием молекул поверхностно-активных веществ. Также возможно применять клетки микроорганизмов благодаря разнообразию форм, экономической выгоде, повторяемости морфологии и их экологичности [4]. Несмотря на то что применение клеток в качестве темплатов описано в литературе, микроорганизмы в качестве порообразующих шаблонов не использовались для получения антисептических материалов.

Сформированы образцы антисептических материалов: в первом виде в качестве порообразующего агента были применены бактерии *Paracoccus yeei* ВКМ В-3302, во втором порообразующие агенты не применялись. Для формирования материала использованы тетраэтокисисилан и метилтриэтоксисилан 50 к 50 об. %, поскольку такое соотношение позволяет сформироваться кремниевой оболочке вокруг микроорганизмов [5]. Клетки удаляли отжигом при различных температурах. Десорбция октенидина (ОКТ) определена методом УФ-спектроскопии, получены кинетические кривые высвобождения для двух видов матриц (рис. 1 и 2).

Наибольшее высвобождение октенидина из первого вида матриц наблюдается при температуре отжига 800 °С, что может быть связано с увеличением площади поверхности из-за удаления клеток микроорганизмов. Заметно наличие двух стадий: резкого выброса и равномерной замедленной десорбции. Применение температур

* Исследование выполнено при поддержке гранта Правительства Тульской области в области науки и технологий 2023 г. по договору ДС/111/БАСиБ1/23/ТО от 27.09.2023

© Е. А. Ланцова, 2024

менее 800 °С приводит к меньшей десорбции ОКТ из матриц, также использование более высоких температур является неэффективным, вероятно из-за спекания материала.

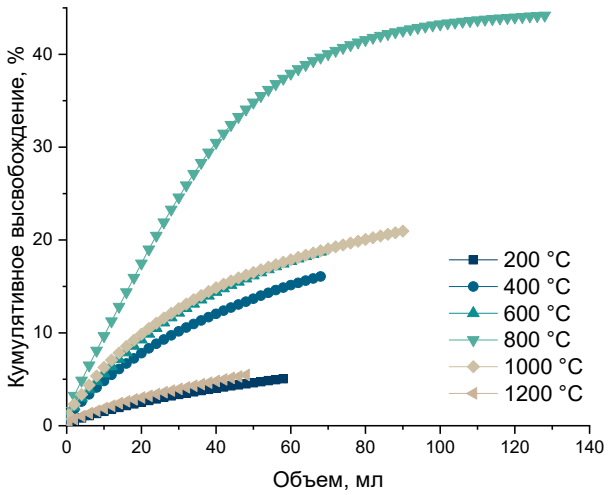


Рис. 1. Высвобождение ОКТ из образцов гибридных антисептических материалов с использованием клеток

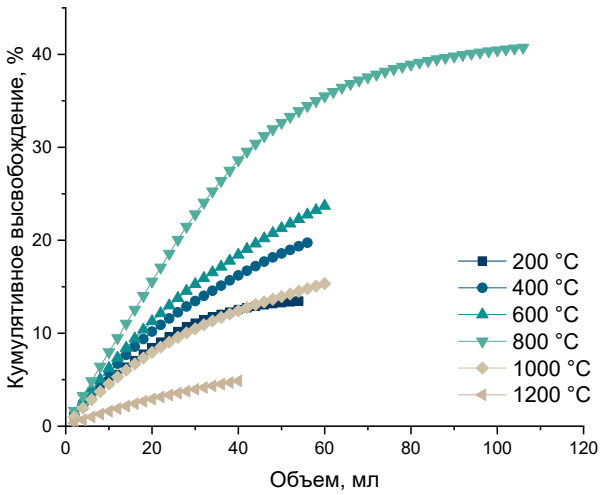


Рис. 2. Высвобождение ОКТ из образцов гибридных антисептических материалов без использования клеток

Для второго вида материалов, сформированных без использования клеток, также наиболее оптимальной является температура отжига 800 °С. Образцы, термически обработанные при других температурах, характеризуются сходным между собой профилем высвобождения.

Наиболее перспективным материалом для дальнейшего изучения является матрица первого вида, полученная при использовании клеток бактерий с последующим отжигом при 800 °С, поскольку характеризуется большей сорбционной способностью (0,7516 мг ОКТ на 1 мг матрицы) и достаточно эффективным высвобождением (45,5 %). Это позволяет выбрать образец материала для проведения дальнейшего исследования антисептических свойств по отношению к бактериям-фитопатогенам *Rhodococcus fascians* ВКМ Ac-1462.

Литература

1. Serwecińska L. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: A Risk to the Environment and to Public Health // Water. 2020. Vol. 12, No. 12. P. 3313

2. Ammonium Disinfectants and Antiseptics: Tolerance, Resistance and Potential Impact on Antibiotic Resistance // Antimicrob. Resist. Infect. Control. 2023. Vol. 12, № 1. P. 1–14.

3. Pezzoni M., Catalano P. N., Pizarro R. A. et al. Antibiofilm Effect of Supramolecularly Templated Mesoporous Silica Coatings // Mater. Sci. Eng. C. 2017. Vol. 77. P. 1044–1049.

4. Ebrahiminezhad A., Najafipour S., Kouhpayeh A. et al. Facile Fabrication of Uniform Hollow Silica Microspheres Using a Novel Biological Template // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2014. Vol. 118. P. 249–253.

5. Ланцова Е. А. Влияние ультрафиолетового облучения на дыхательную активность иммобилизованных в золь-гель матрицы бактерий PARACOCCUS YEEI // Материалы Междунар. науч. форума обучающихся «Молодежь в науке и творчестве». 2021. С. 156.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-84

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КЛЕТОК ПОЧКИ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА HEK-293

CHARACTERISATION OF CELL SPHEROIDS DERIVED FROM HUMAN EMBRYONIC KIDNEY HEK-293

А. К. Лапенко, Е. Р. Ольховая, Т. А. Чудновец, П. С. Купцова, Л. Н. Комарова

Обнинский институт атомной энергетики

A. K. Lapenko, E. R. Ol'hovaya, T. A. Chudnovec, P. S. Kupcova, L. N. Komarova

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering

✉ alianalapenko@yandex.ru

Аннотация

Трехмерные клеточные модели активно используются для изучения цитотоксичности и эффективности фармакологических соединений. В этом контексте актуальным является создание и характеристика оптимальных тест-систем на основе клеточных сфероидов. В этой работе описаны морфологические и метаболические характеристики трехмерной модели, полученной на основе клеток эмбриональной почки человека HEK-293.

Abstract

Three-dimensional cellular models are actively used to study the cytotoxicity and efficacy of pharmacological compounds. In this context, the creation and characterisation of optimal test systems based on cell spheroids is relevant. This paper describes the morphological and metabolic characteristics of a three-dimensional model derived from human embryonic kidney HEK-293.

Трехмерные клеточные модели обеспечивают физиологическое состояние клеточных популяций [1]. Данное качество обуславливает их применение в тестировании фармакологических соединений наряду с классическими методами культивирования клеток [2]. В этой работе приведены результаты исследования метаболической активности трехмерных клеточных моделей (сфероидов), полученных из клеток почки эмбриона человека HEK-293.

Культивирование клеток в монослое проводили по стандартной методике [3]. Клеточные сфероиды получали методом низкоадгезивной поверхности, используя планшеты, покрытые 1,5%-й агарозой. Для получения сфероидов использовали следующие концентрации клеток: 5; 8; 10; 15; 30; 60 тыс. клеток/сфероид. Морфологическое описание клеточных сфероидов проводили с помощью инвертированного микроскопа «Микромед И» и программного обеспечения ImageJ. Оценку метаболической активности сфероидов проводили с помощью МТТ-теста в течение 10 дней.

Клеточный агрегат с неровными краями формировался на первые сутки культивирования. Плотный клеточный агрегат, устойчивый к механическому воздействию, формировался на третьи сутки культивирования. Размер клеточных сфероидов уменьшался в процессе культивирования независимо от посевной концентрации. Результаты МТТ-теста показали, что наиболее выраженное снижение метаболической активности наблюдалось у сфероидов с посевной концентрацией 60 тыс. кл./сфероид. При посевных концентрациях 30; 15; 10 тыс. кл./сфероид метаболическая активность клеточных сфероидов также снижалась. Рост метаболической активности наблюдался при посевных концентрациях 8; 5 тыс. кл./сфероид. Полученные результаты могут быть обусловлены особенностью формирования гетерогенных клеточных популяций внутри сфероида.

Представляют интерес дальнейшие исследования особенностей метаболической активности сфероидов, полученных из разных клеточных линий, с целью установления закономерностей процессов, происходящих в трехмерных клеточных моделях. Такие исследования особенно актуальны в области клеточной биологии и фармакологии.

Литература

1. Кудан Е. В., Кудан С. П., Каршиева С. Ш. Определение активности цитостатиков в 3D-условиях культивирования в сравнении с монослойной культурой // Цитология. 2021. Т. 63, № 3. С. 244–255.

2. Białkowska K. et al. Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures — examples of methods of preparation and the most important application // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, No. 17. P. 6225.

3. Черкасова Е. И., Брилкина А. А. Работа с культурами клеток: учеб.-метод. пособие. Н. Новгород: Изд-во Нижегород. ун-та, 2015. 57 с.

© А. К. Лапенко, Е. Р. Ольховая, Т. А. Чудновец, П. С. Купцова, Л. Н. Комарова, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-85

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛИПАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA* SPECIES ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЫРОДЕЛИИ

ISOLATION AND PURIFICATION OF LIPASE FROM YEAST OF *YARROWIA* SPECIES TO BE USED IN CHEESE-MAKING TECHNOLOGY

О. Д. Левчук, Л. И. Сапунова

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск

O. D. Leuchuk, L. I. Sapunova

Institute of Microbiology NAS of Belarus, Minsk

✉ demeshkoo@mail.ru

Аннотация

В результате проведенных исследований получен препарат гомогенной внеклеточной липазы *Yarrowia* sp. Показана возможность ее использования в сыроделии как импортозамещающего аналога липолитического фермента животного происхождения.

Abstract

The conducted investigations resulted in preparation of homogeneous extracellular lipase of Yarrowia sp. Possibility was demonstrated to apply it in cheese-making process as an import-substituting analog of lipolytic enzyme of animal origin.

Липаза (E.C.3.1.1.3) — фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз триацилглицеридов с образованием жирных кислот и глицерина. Она находит применение в косметике, медицине, бытовой химии и пищевой промышленности [1, 2]. Липаза используется в производстве сыров, катализируя гидролиз триглицеридов молочного жира. Благодаря действию фермента сыр приобретает характерный вкус и аромат. Для ускорения созревания сыра в молоко или сырную массу вносят липазу, которая активизирует липолитические процессы [3].

В качестве наиболее перспективных продуцентов липазы рассматривают дрожжи рода *Yarrowia*. Липазы дрожжей субстрат-специфичны и стабильны в широком диапазоне физико-химических условий катализа. Преимущественно внеклеточная локализация липолитических ферментов позволяет легко выделять и очищать их, что снижает производственные затраты и делает эти микроорганизмы предпочтительными продуцентами ферментных белков [4].

Объект исследования — штамм *Yarrowia* sp., отобранный в качестве продуцента внеклеточной липазы.

Дрожжи выращивали глубинным способом в среде, содержащей: глюкозу — 0,5 %; пептон — 2; дрожжевой экстракт — 0,5 %. Условия культивирования — температура 30 °С, перемешивание — 220 об/мин, длительность — 24 ч.

После культивирования отделяли биомассу *Yarrowia* sp. от культуральной жидкости центрифугированием (10 000 об/мин, 15 мин, 4 °С). Выделение, очистку и концентрирование ферментного белка проводили методом ионообменной хроматографии с использованием в качестве сорбента Whatman® anion exchange cellulose DE-32 (Германия). Белок элюировали 100 мМ NaCl.

Для выявления культур, синтезирующих липазу, и фракций, содержащих ферментный белок, применяли модифицированную дифференциально-диагностическую среду с феноловым красным [5].

Полученный в результате хроматографической очистки препарат липазы анализировали в денатурирующем 15%-м полиакриламидном геле согласно [6]. В качестве маркера молекулярных масс (кДа) стандартных белков использовали BlueEye Prestained Protein Marker (Jena Bioscience, Германия).

Метод определения липолитической активности основан на гидролизе 1,2,3-трибутирилглицерола. За единицу липолитической активности принимали количество фермента, катализирующего гидролиз 1,2,3-трибутирилглицерола с образованием 1 мкмоля масляной кислоты при 37 °С в течение 1 мин [7].

В результате скрининга на дифференциально-диагностической среде выбран штамм *Yarrowia* sp., продуцирующий внеклеточную липазу в количестве 3 ед/мл. Выход фермента по активности после хроматографической очистки составил 83 %.

© О. Д. Левчук, Л. И. Сапунова, 2024

Электрофоретический анализ очищенной липазы *Yarrowia* sp. показал ее гомогенность и соответствие молекулярной массе ферментных белков дрожжей рода *Yarrowia*, представленных в базах данных (рис. 1) [8].

Свойство липазы *Yarrowia* sp. гидролизовать жиры молока проверяли в лабораторных условиях в соответствии с технологией, применяемой в сыроделии. Анализ продуктов ферментативного гидролиза жиров молока проводили методом тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинах (Merck KGaA, Германия) в системе растворителей гексан : диэтиловый эфир : ледяная уксусная кислота (78 : 25 : 2). Продукты реакции проявляли 10%-м спиртовым раствором фосфомолибденовой кислоты при 180 °С в течение 10 мин.

Результат хроматографического разделения продуктов гидролиза показал сходный профиль насыщенных и ненасыщенных жирных кислот при гидролизе молока липазой *Yarrowia* sp. (5 и 10 ед. активности) и прегастральными липазами телят и козлят (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о потенциальной возможности использования микробного фермента в качестве альтернативы липазы животного происхождения.

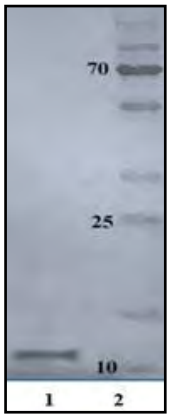


Рис. 1. SDS-электрофореграмма белков, содержащихся в препарате липазы *Yarrowia* sp.:
1 — липаза *Yarrowia* sp.;
2 — маркер молекулярных масс стандартных белков

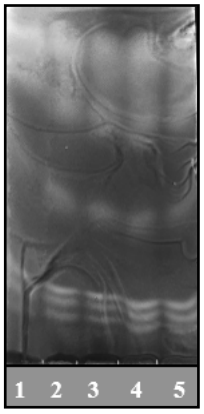


Рис. 2. Хроматограмма продуктов ферментативного гидролиза жиров молока (в негативном изображении): *1* — контроль (молоко); *2*, *3* — 5 и 10 ед. липазы соответственно; *4*, *5* — прегастральные липазы козлят и телят соответственно

На заключительном этапе исследований в РУП «Институт мясо-молочной промышленности» анализировали жирнокислотный состав образцов сыра, изготовленных с применением дрожжевой липазы и коммерческих препаратов прегастральных липаз телят и козлят, используемых в Республике Беларусь в сыроделии. Результаты анализа показали практически полное соответствие массовых долей насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в сырах, приготовленных с использованием липаз животного и микробного происхождения.

Литература

1. Treichel H. et al. A review on microbial lipases production // Food Bioprocess Technol. 2010. Vol. 3. P. 182–196.

2. Franken L. P. G. Effect of treatment with compressed propane on lipases hydrolytic activity // Food Bioprocess Technol. 2010. Vol. 3, No. 4. P. 511–520.

3. Andualema B., Gessesse A. Microbial lipases and their industrial applications: re-view // Biotechnol. 2012. Vol. 11, No. 3. P. 100–118.

4. Bharathi D., Rajalakshmi G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification // Biocatal. Agric. Biotechnol. 2019. Vol. 22. P. 101368.

5. Мамедова Л. В., Пучкова Л. И., Лебедев Л. Р. Методика скрининга штаммов-продуцентов липолитических ферментов // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. 2016. № 10–1. С. 32–35.

6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. Vol. 227, No. 5259. P. 680–685.

7. Самойлова Ю. В., Сорокина К. Н., Нуриддинов М. А., Розанов А. С. Разработка биокатализатора для переэтерификации пищевых жиров с использованием иммобилизованных ферментов липаз // Высокие технологии в современной науке и технике: сб. науч. тр. ТПУ. 2013. С. 119–123.

8. Brenda // The comprehensive enzyme information system. URL: https://www.brenda-enzymes.org/literature.php?e=3.1.1.3&r=678397 (accessed 01.10.2023).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-86

ИНВЕРТИРОВАННЫЕ КОНЦЕВЫЕ ПОВТОРЫ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЕМОНСТРИРУЮТ ПРОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ В ГАМКЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ *IN VITRO* *

INVERTED TERMINAL REPEATS OF THE ADENO-ASSOCIATED VIRUS DEMONSTRATE PROMOTER ACTIVITY IN GABAERGIC NEURONS *IN VITRO*

Е. А. Лунев[1–3], Е. А. Воловиков[4], С. В. Попов[5], Т. В. Егорова[1,2], М. В. Бардина[1–3]

[1] *Институт биологии гена РАН, Москва*
[2] *ООО «Марлин Биотех», Сочи*
[3] *Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Москва*
[4] *Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю. М. Лопухина, Москва*
[5] *Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Минздрава России, Москва*

E. A. Lunev[1–3], E. A. Volovikov[4], S. V. Popov[5], T. V. Egorova[1,2], M. V. Bardina[1–3]

[1] *Institute of Gene Biology RAS, Moscow*
[2] *Marlin Biotech, LLC, Sochi*
[3] *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Moscow*
[4] *Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, FMBA of Russia, Moscow*
[5] *Endocrinology Research Center, Moscow*

✉ e.lunev.marlin@gmail.com

Аннотация

Используя подход высокопроизводительного РНК-секвенирования, мы обнаружили промоторную активность ITR второго серотипа AAB в трансдуцированных ГАМКергических нейронах, полученных из ИПСК.

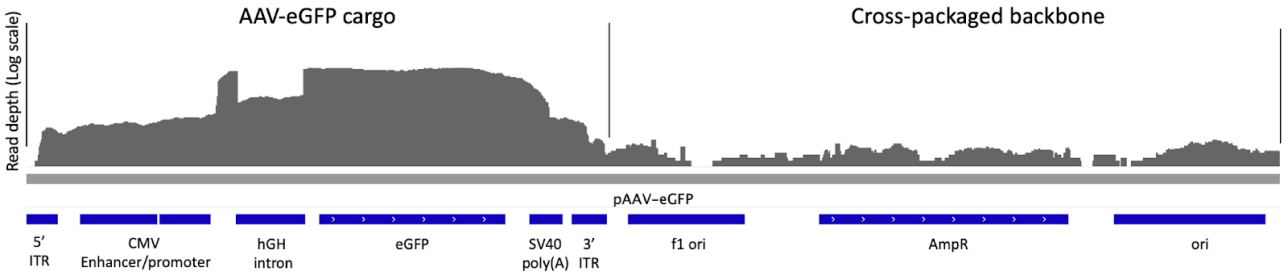
Abstract

We detected the ITR promoter activity of the AAV2 in transduced iPSCs-derived GABAergic neurons by RNAseq analysis.

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (рAAB) являются перспективным вектором для генной терапии благодаря своей безопасности и свойству эффективно доставлять генетический материал в клетки-мишени. Геном AAB фланкирован инвертированными концевыми повторами (ITR), которые участвуют в репликации и упаковке вирусного генома. Известно, что эти последовательности также способны проявлять промоторную активность [1]. Недавние исследования на приматах показали, что неспецифическая транскрипция под контролем ITR в нейронах мозжечка способна приводить к неврологическим нарушениям [2]. Экспрессия с последовательностей ITR в различных тканях и типах клеток мало изучена и может зависеть от дизайна рекомбинантного вектора. Целью нашего исследования являлось тестирование промоторной активности ITR второго серотипа AAB в ГАМКергических нейронах *in vitro*. Геном рAAB состоял из CMV промотора с одноименным энхансером, hGH интрона, гена *GFP* и сигнала полиаденилирования SV40 и был фланкирован ITR второго серотипа AAB. Для трансдукции клеток геном рAAB был упакован в вирусные капсиды серотипа DJ. ГАМКергические нейроны, полученные направленной дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, заражали в количестве 2×10^{12} геномных копий на лунку 12-луночного планшета. Экспрессию маркера ГАМКергических нейронов *GAD67* подтверждали с помощью кПЦР, эффективность трансдукции контролировали за счет экспрессии репортерного гена *GFP*. В результате РНК-секвенирования обогащенной полиаденилированными транскриптами библиотеки было получено более 200 000 000 прочтений на образец. Прочтения выравнивали на референсный транскриптом GRCh38 (Ensembl), дополненный последовательностью целевой плазмиды, используемой при производстве рAAB. Как и ожидалось, наибольшее количество прочтений было картировано на область *GFP*, поскольку экспрессия этого гена находилась под контролем сильного CMV промотора (см. рисунок). Однако значительное количество прочтений также картировалось на регионы генома рAAB, примыкающие

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 23-25-00323).
© Е. А. Лунев, Е. А. Воловиков, С. В. Попов, Т. В. Егорова, М. В. Бардина, 2024

к ITR. Кроме того, часть прочтений выравнивалась на кросс-упакованный плазмидный остов, содержащий ген устойчивости к ампициллину и точку начала репликации плазмидного вектора. Полученные нами результаты подтверждают промоторную активность ITR второго серотипа AAB в ГАМКергических нейронах и подчеркивают важность учета этого эффекта в нейробиологических исследованиях. В свою очередь, модификации рекомбинантного AAB-вектора, направленные на снижение промоторной активности ITR, позволят повысить безопасность генотерапевтического препарата.



Пример покрытия последовательности провирусного вектора pAAV-eGFP прочтениями, полученными по результатам РНК-секвенирования трансдуцированных ГАМКергических нейронов

Литература

1. Earley L. F., Conatser L. M., Lue V. M. et al. Adeno-Associated Virus Serotype-Specific Inverted Terminal Repeat Sequence Role in Vector Transgene Expression // Human Gene Therapy. 2020. Vol. 31, No. 3–4. P. 151–162.

2. Keiser M. S., Ranum P. T., Yrigollen C. M. et al. Toxicity after AAV delivery of RNAi expression constructs into nonhuman primate brain // Nat. Med. 2021. Vol. 27, No. 11. P. 1982–1989.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-87

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОГРУЖЕННОЙ КУЛЬТУРЫ *HERICIUM CORALLOIDES* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСТОЧНИКОВ ПИТАНИЯ

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE SUBMERGED CULTURE OF *HERICIUM CORALLOIDES* DEPENDING ON FOOD SOURCES

В. С. Лысакова

Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе, Москва

V. S. Lysakova

Gause Institute of New Antibiotics, Moscow

✉ lisakova2000@gmail.com

Аннотация

В работе изучали антибактериальную и антифунгальную активности различных экстрактов погруженной культуры базидиомицета *Hericium coralloides*. Экстракты культуральной жидкости и погруженной биомассы обладали высокой антимикробной активностью. Была выявлена зависимость выработки активных метаболитов от источников питания, высокая активность была отмечена при использовании глюкозы и дрожжевого экстракта в качестве источников углерода и азота.

Abstract

The antibacterial and antifungal activity of various extracts of the submerged culture of the basidiomycete *Hericium coralloides* was studied. Extracts of culture liquid and Submerged biomass had high antimicrobial activity. The dependence of the production of active metabolites on food sources was revealed, high activity was noted when using glucose and yeast extract as sources of carbon and nitrogen.

Ежовик коралловидный (*Hericium coralloides*) — редкий съедобный ксилотроф, произрастающий в лиственных и смешанных лесах. Этот базидиомицет в настоящее время изучают как источник антиоксидантных, противоопухолевых метаболитов, а также веществ, способных стимулировать экспрессию факторов роста нервов [1, 2].

Цель работы — выявить зависимость спектра и величины антимикробной активности экстрактов *H. coralloides* в зависимости от источников углерода и азота.

Погруженное культивирование *H. coralloides* штамм 45 проводили на 6 жидких питательных средах (Ф1–Ф6), представляющих собой сочетание источников углерода (глюкоза, меласса, сахар-сырец) и источников азота (пептон, дрожжевой экстракт). После завершения культивирования погруженную биомассу отделяли от культуральной жидкости (кж) фильтрованием через лавсан.

На первом этапе изучали этилацетатные экстракты нативных фильтратов культуральных жидкостей, определение антимикробной активности проводили методом диффузии из лунок в агар с использованием панели тест-культур, включающей грамположительные и грамотрицательные бактерии, дрожжеподобные и мицелиальные грибы. Наибольшую широту и величину антимикробной активности обеспечивали среды с глюкозой. Наиболее эффективным было сочетание глюкозы с дрожжевым экстрактом (среда Ф6). В отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Bacillus subtilis* были активны все полученные экстракты с зонами подавления 20+ мм. Только экстракт Ф6 показал активность в отношении грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (12 мм). В отношении грибов (*Fusarium oxysporum* и *Aspergillus niger*) невысокую активность показали все экстракты, за исключением Ф3 (сахар-сырец/пептон). Экстракт Ф6 был более активен (17 мм) по сравнению с остальными экстрактами.

Во время второго этапа исследования была проверена активность этанольных экстрактов погруженной биомассы, полученной на разных средах. Антимикробная активность оценивалась методом диффузии из лунок в агар. В этом опыте наибольшая активность так же, как и в случае с экстрактами кж, была отмечена на среде Ф6: величина зоны подавления роста составила 25+ мм в отношении грамположительных бактерий и 13+ мм в отношении *F. oxysporum* и *A. niger*. Все образцы не показали активность в отношении *P. aeruginosa*. Активность экстрактов биомассы была ниже активности экстрактов кж в отношении каждой из тест-культур.

© В. С. Лысакова, 2024

На основе этих результатов была модифицирована ферментативная среда и далее определены значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) экстракта кж на более широкой панели тест-культур, включавшей резистентные штаммы бактерий (см. таблицу). Была показана высокая активность в отношении грамположительных бактерий и грибов.

МПК целевого экстракта культуральной жидкости *H. coralloides*

Грамположительные бактерии	**МПК, мкг/мл**	**Грамотрицательные бактерии**	**МПК, мкг/мл**	**Грибы**	**МПК, мкг/мл**
Staphylococcus aureus	80	Escherichia coli	> 1280	Candida albicans	64
Staphylococcus epidermidis*	160	Salmonella cholerasuis	> 1280	Aspergillus niger	500
Staphylococcus haemoliticus*	160	Klebsiella pneumoniae	> 1280	–	
Enterococcus faecium*	320	Proteus vulgaris	640	–	

* Клинические штаммы, устойчивые к ванкомицину

Таким образом, был показан спектр и величина антимикробной активности экстрактов *H. coralloides*. Прежде всего активность зависела от источника углерода питательной среды. Выявлено наиболее эффективное сочетание источников питания, обеспечивающих антибактериальную и (или) антифунгальную активность экстрактов кж и биомассы.

Литература

1. Zhang J. et al. Antioxidant and anti-aging activities of ethyl acetate extract of the coral tooth mushroom, Hericium coralloides (Agaricomycetes) // Int. J. Med. Mushrooms. 2019. Vol. 21 (6).

2. Wittstein K. et al. Corallocins A–C, nerve growth and brain-derived neurotrophic factor inducing metabolites from the mushroom Hericium coralloides // J. Nat. Prod. 2016. Vol. 79 (9). P. 2264–2269.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-88

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ HSPA14

CREATION OF RECOMBINANT MYCOBACTERIAL STRAINS EXPRESSING HSPA14

А. Ю. Маркова[1,2], Л. Г. Кондратьева[1,3]

[1]*Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*
[2]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3]*Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*

A. Yu. Markova[1,2], L. G. Kondratyeva[1,3]

[1]*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*
[2]*Lomonosov Moscow State University*
[3]*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*

✉ ayumarkova@mail.ru

Аннотация

Известно, что TLR являются основными рецепторами на поверхности клеток врожденного иммунитета, участвующими в обучении этих клеток. Получена плазмида, содержащая ген агониста TLR — HSPA14, для создания рекомбинантных микобактериальных штаммов, экспрессирующих активаторы ТИ. Проведена трансформация микобактерий полученными конструкциями, лизаты клеток протестированы с помощью вестерн-блот-анализа.

Abstract

TLR are known as the main receptors on the surface of innate immune cells and involved in the training of these cells. A plasmid containing the TLR agonist gene, HSPA14, was obtained to create recombinant mycobacterial strains expressing trained immunity activators. Mycobacteria were transformed by this plasmid, cell lysates were analyzed using western blot.

Клетки врожденной иммунной системы способны не только распознавать патоген и реагировать на него посредством фагоцитоза и презентации антигенов, но и проявлять способность к долгосрочным адаптивным характеристикам, известными как феномен тренированного иммунитета. Тренированный иммунитет (ТИ) — программирование клеток врожденного иммунитета (моноцитов, макрофагов, дендритных клеток) при первом воздействии патогена, которое обеспечивает более сильный эффект при вторичном появлении патогена. Одними из основных рецепторов, распознающих сигналы от патогенов и активирующих врожденный иммунитет, являются Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors, TLR). Активация TLR приводит к продукции провоспалительных цитокинов. Агонистами TLR являются патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP), среди которых компоненты клеточной стенки бактерий, двуцепочечная РНК и сигналы с поверхности поврежденных клеток. В частности, к агонистам TLR относится белок теплового шока HSPA14. В норме HSPA14 выполняет шаперонную функцию, его появление на мембране является сигналом клеточного стресса для TLR2 и TLR4. Ген HSPA14 был выбран для создания генетически модифицированных бактериальных штаммов, продуцирующих иммуноактиваторные белки на поверхности клетки для эффективного формирования ТИ. Одной из широко известных бактериальных вакцин, индуцирующей ТИ, является микобактериальная вакцина БЦЖ.

Лидерный пептид микобактериального гена Ag19 размеров 84 нт был получен амплификацией перекрывающихся праймеров методом ПЦР. Далее методом CPEC (*Circular Polymerase Extension Cloning*) с использованием высокоточной Fusion полимеразы последовательность Ag19 клонировали в плазмиду pMV261, проводили трансформацию клеток *E. coli* и отбор на среде с канамицином. Состав конструкции pMV261-Ag19 был подтвержден ПЦР-скринингом, рестриктным анализом и секвенированием по методу Сэнгера. Ген GFP был ампилифицирован с использованием праймеров, содержащих сайт узнавания *SalI* на 5'-конце и последовательность FLAG на 3'-конце, и коммерческой плазмиды pEGFP-N1 в качестве матрицы. Вставку GFP-FLAG и вектор pMV261-Ag19 гидролизовали по *SalI* и *HpaI*, а затем лигировали в течение ночи при 16 °C. Лигатом трансформировали клетки *E.coli* и проводили отбор на среде с канамицином. Состав полученной конструк-

© А. Ю. Маркова, Л. Г. Кондратьева, 2024

ции pMV261-Ag19-GFP-FLAG был подтвержден ПЦР-скринингом и секвенированием по методу Сэнгера. Ген HSPA14 был амплифицирован с помощью ПЦР с использованием праймеров, содержащих сайт узнавания *SalI* на 5'-конце и сайт *PsiI* на 3'-конце, и ранее полученной в лаборатории плазмиды, кодирующей этот ген. Далее аналогично конструкции pMV261-Ag19-GFP-FLAG была получена плазмида pMV261-Ag19-HSPA14-FLAG и подтвержден ее состав.

Затем была проведена трансформация модельных микобактерий *M. smegmatis* плазмидой pMV261-Ag19-GFP-FLAG, получены клоны, содержащие корректную плазмиду, получены лизаты клеток и протестированы с помощью вестерн-блот-анализа с использованием антител к эпитопу FLAG и GFP. Аналогично *M. smegmatis* трансформировали плазмидой pMV261-Ag19-HSPA14-FLAG, лизаты клонов с корректной плазмидой также протестировали с помощью вестерн-блот-анализа с использованием антител к эпитопу FLAG и HSPA14.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-89

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК НА СИАЛИРОВАНИЕ ДАРБЭПОЭТИНА-АЛЬФА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРОДУЦЕНТА НА ОСНОВЕ *CHO* В РЕЖИМЕ FED-BATCH

STUDY OF THE EFFECT OF ADDITIVES ON THE SIALYLATION OF DARBEPOETIN-ALFA IN CHO-BASED CULTIVATION IN FED-BATCH MODE

Е. М. Миронова, Е. А. Пономаренко, А. К. Белов, А. О. Грюк, Р. А. Марыгин, Е. В. Воронина, Ю. А. Серегин

ООО «ФАРМАПАРК», Москва

E. M. Mironova, E. A. Ponomarenko, A. K. Belov, A. O. Gryuk, R. A. Marygin, E. V. Voronina, Y. A. Seregin

PHARMAPARK, LLC, Moscow

✉ e.mironova@pharmapark.ru

Аннотация

В рамках представленной работы показано эффективное использование сочетания добавок N-ацетил-D-маннозамина, бутирата натрия и галактозы в ходе культивирования клеток CHO, продуцирующих дарбэпоэтин-альфа, для увеличения выхода высокосиалированных форм.

Abstract

Within the presented study, a combination of N-acetyl-D-mannosamine, sodium butyrate, and galactose additives was showed for use during the cultivation of CHO cells producing darbepoetin alfa. The addition of these chemicals enabled an increase in the yield of highly sialylated forms of darbepoetin alfa.

Материалы и методы

Для культивирования использовали продуцент на основе суспензионной линии *CHO*. Культивирование осуществляли в режиме fed-batch на среде PowerCHO-2CD (Lonza, Швейцария) с ежедневным внесением подпитки EX-CELL Advanced CHO Feed 1 (Merck, США). Анализ концентрации проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ, анализ гликанов и степени сиалирования — с помощью нормально-фазовой ВЭЖХ с флуоресцентной меткой.

Результаты

В рамках исследования параметров качества было подтверждено, что при культивировании продуцента на основе *CHO* образуются 22 заряженные изоформы, из которых в финальном полупродукте после очистки остаются 6 изоформ, с наибольшей степенью сиалирования.

В связи с этим для достижения биоподобия дарбэпоэтина в сравнении с оригинальным препаратом «Аранесп» была предложена оптимизация профиля гликозилирования, направленная на увеличение выхода высокосиалированных форм при уменьшении доли гликанов с низкой степенью разветвленности, а также асиалированных, моно- и дисиалированных.

Для выполнения поставленной задачи было решено добавлять N-ацетил-D-маннозамин при культивировании, как предшественника сиаловых кислот. Показано, что его внесение в концентрации до 40 мМ приводило к незначительному увеличению выхода высокосиалированных форм дарбэпоэтина. Повышение концентрации до 100 мМ негативно влияло на жизнеспособность продуцента и его культуральные характеристики, при этом увеличения степени сиалирования не наблюдалось.

Сочетание N-ацетил-D-маннозамина (40 мМ) и бутирата натрия (0,3 мМ) оказалось эффективнее, чем использование только предшественника сиаловых кислот, но недостаточным для достижения биоподобия.

В результате исследования влияния постепенного снижения температуры культивирования с 37 до 30 °C было показано, что доля гликанов с высокой степенью разветвленности увеличивается. Однако при одновременном изменении температуры культивирования и использовании вышеупомянутых добавок желаемого биоподобия достичь не удавалось.

Для решения проблемы было предложено дополнительно внести галактозу в качестве субстрата для обеспечения эффективного процессинга разветвленных гликанов, содержащих сиаловые кислоты на конце.

Таким образом, сочетание галактозы в минимально эффективной концентрации 30 мМ с N-ацетил-D-маннозамином (40 мМ) и бутиратом натрия (0,3 мМ) способствовало повышению доли гликанов с высокой степенью разветвленности и сиалирования более чем в 3 раза, что позволило увеличить выход целевых изоформ белка после очистки и достичь биоподобия в пределах изменчивости оригинального препарата «Аранесп».

© Е. М. Миронова, Е. А. Пономаренко, А. К. Белов, А. О. Грюк, Р. А. Марыгин, Е. В. Воронина, Ю. А. Серегин, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-90

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАХВАТА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МАГНИТНЫМИ МИКРОСФЕРАМИ, ПОКРЫТЫМИ ДУБИЛЬНОЙ КИСЛОТОЙ *

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF EXTRACELLULAR VESICLE CAPTURE BY MAGNETIC MICROSPHERES COATED WITH TANNIC ACID

Е. О. Моисеева[1], В. С. Чернышёв[2], А. М. Ященок[1]

[1]Сколковский институт науки и технологий, Москва
[2]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

E. O. Moiseeva[1], V. S. Chernyshev[2], A. M. Yashchenok[1]

[1]Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow
[2]Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

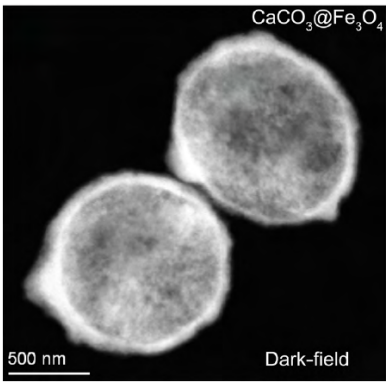
✉ a.yashchenok@skoltech.ru

Аннотация

Микросферы карбоната кальция, загруженные наночастицами магнетита, получены для выделения внеклеточных везикул (EVs) из биологических жидкостей. Для направленного захвата EVs поверхность магнитных микросфер покрыта дубильной кислотой методом послойной сборки. Магнитные микросферы использованы для выделения EVs из среды для культивирования клеток. Количественные данные показали, что была достигнута эффективность улавливания 60 %.

Abstract

Calcium carbonate microspheres loaded with magnetite nanoparticles are designed for isolation of extracellular vesicles (EVs) from biological fluids. The surface of magnetic microspheres is then coated with tannic acid by a layer-by-layer method, which induces EV capture on magnetic microsphere. The magnetic microspheres were applied to isolate EVs from cell culture media. The quantitative data revealed that 60 % capture efficiency was achieved.



ПЭМ-изображение магнитных микросфер (MMS) [3]

Выделяемые клетками мембранные везикулы микро- и наноразмера чаще всего называют внеклеточными везикулами (EVs). Известно, что EVs участвуют во многих физиологических процессах, включая возникновение и прогрессирование различных патологических процессов, в том числе онкологических заболеваний [1]. Однако выделение EVs из сложных биологических жидкостей с высоким выходом и достаточной чистотой остается сложной задачей. Стандартные методы (ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, хроматография, осаждение) являются трудоемкими, требуют применения дорогостоящих приборов или приводят к загрязнению EVs. Магнитная сепарация широко распространена для выделения биомолекул и имеет большой потенциал для выделения EVs, так как характеризуется доступностью и обеспечивает высокую эффективность.

В данной работе магнитные микросферы (MMS) получены путем адсорбции наночастиц оксида железа (Fe_3O_4) в поры карбоната кальция ($CaCO_3$) методом кристаллизации из раствора (*freezing-induced loading*, FIL) [2]. Микрофотографии MMS, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), приведены на рисунке. Поверхность MMS загруженных Fe_3O_4 покрывали дубильной кислотой (TA) методом послойного нанесения (LbL), где в качестве связующего полиэлектролита использовали поливинилпирролидон (PVP), бычий сывороточный альбумин (BSA) или поли(аллиламин гидрохлорид) (PAH).

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 23-74-00022).

© Е. О. Моисеева, В. С. Чернышёв, А. М. Ященок, 2024

Показано, что связывание EVs с поверхностью магнитных микросфер (MMS) происходит за счет взаимодействия дубильной кислоты и мембраны везикул. Согласно данным спектроскопии ядерно-магнитного резонанса, ТА связывается с фосфолипидами за счет водородных связей и путем образования катион-π комплекса между бензольным кольцом галловой кислоты и четвертичным амином холинового остатка. Более того, масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI) подтвердила, что белки, встроенные мембрану, также могут образовывать комплекс с ТА.

Чтобы оценить эффективность выделения EVs из биологических образцов, были использованы EVs, находящиеся в супернатанте клеточной линии рака толстой кишки человека HCT116. Эффективность разработанной методики была оценена с использованием количественных и качественных методов анализа, таких как анализ траекторий наночастиц (NTA), определение содержания белка (BCA) и сканирующая электронная микроскопия (SEM). Разработанная методика имеет высокий потенциал применения, так как продемонстрировала сравнимую с гельпроникающей хроматографией (SEC) эффективность выделения EVs.

Литература

1. Becker A. et al. Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis // Cancer Cell. 2016. Vol. 30, No. 6. P. 836–848.

2. German S. V. et al. High-efficiency freezing-induced loading of inorganic nanoparticles and proteins into micron-and submicron-sized porous particles // Sci. Rep. 2018. Vol. 8, No. 1. P. 17763.

3. Grishaev N. A. et al. Studying the small extracellular vesicle capture efficiency of magnetic beads coated with tannic acid // J. Mater. Chem. B. 2024.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-91

РАЗРАБОТКА ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО АПТАСЕНСОРА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА КАРДИОМАРКЕРА ТРОПОНИНА I

DEVELOPMENT OF A LATERAL FLOW APTASENSOR FOR RAPID ANALYSIS OF THE CARDIAC MARKER TROPONIN I

Е. П. Морозова[1], В. В. Красицкая[1,2], Л. А. Франк[1,2]

[1] *Институт биофизики СО РАН, Красноярск*
[2] *Сибирский федеральный университет, Красноярск*

E. P. Morozova[1], V. V. Krasitskaya[1,2], L. A. Frank[1,2]

[1] *Institute of Biophysics SB RAS, Krasnoyarsk*
[2] *Siberian Federal University, Krasnoyarsk*

✉ ep.morozova-bf@mail.ru

Аннотация

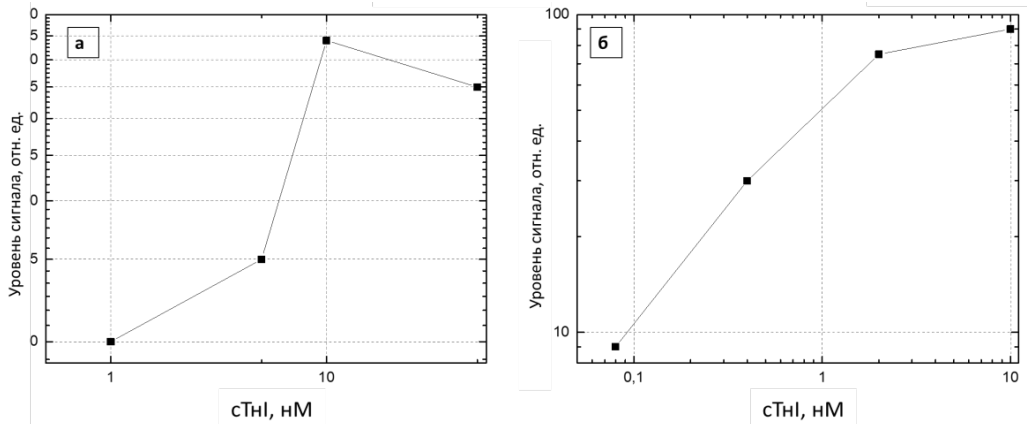
В работе показана принципиальная возможность использования аптамеров в качестве альтернативы антителам для проведения латерального проточного анализа кардиомаркера тропонина I. Была проведена детекция тропонина I в буфере с помощью двух тест-систем, содержащих аптамеры и антитела.

Abstract

This work demonstrated the fundamental possibility of using aptamers as an alternative to antibodies for performing lateral flow analysis of the cardiac marker Troponin I. Detection of Troponin I in a buffer was carried out using two test systems containing aptamers and antibodies.

В настоящее время широко используются системы быстрой диагностики на месте (диагностика *Point-of-Care*), которые могут применяться самостоятельно конечным потребителем вне зависимости от наличия специального помещения или оборудования [1]. Наиболее распространенным вариантом POC-теста является иммунохроматографический анализ, который осуществляется при помощи тест-полосок, содержащих все необходимые для реакции компоненты в готовом виде.

Аптамеры — это короткие одноцепочечные фрагменты ДНК или РНК с уникальной пространственной структурой, способные специфично связываться с мишенью. Благодаря их высокой аффинности, специфичности, стабильности и возможности химического синтеза и модификации различными функциональными группами



Зависимость интенсивности окраски тестовых точек от концентрации сТн I в буфере при детекции мишени тест-полоской с иммобилизованными антителом (*а*) и биотинилированным аптамером (*б*)

© Е. П. Морозова, В. В. Красицкая, Л. А. Франк, 2024

аптамеры рассматривают как перспективную альтернативу антителам, в том числе и при создании биосенсоров диагностически важных маркеров [2].

В настоящей работе был разработан прототип аптасенсора для быстрого выявления тропонина I, который, в свою очередь, является одним из ранних высокоспецифичных маркеров, появление которого в периферической крови свидетельствует о повреждении кардиомиоцитов при инфаркте миокарда. При разработке аптасенсора были использованы два специфичных и высокоаффинных к cTnI ДНК-аптамера, полученные ранее в лаборатории экологических и биолюминесцентных технологий ИБФ СО РАН [3]. В качестве меток использовали наночастицы золота со средним диаметром 30 нм. Был проведен сравнительный анализ чувствительности двух тест-систем, содержащих аптамеры и антитела в качестве иммобилизованных на мембране биоспецифичных молекул (см. рисунок). Таким образом, предел обнаружения для биосенсора с использованием антител составил 0,08 нМ, а для аптасенсора — 1 нМ тропонина I.

Литература

1. Дементьева И. И. и др. Технологии point of care в клинике неотложных состояний // Клиническая лабораторная диагностика. 2013. № 7. С. 5–10.

2. Liu L. S., Wang F., Ge Y., Lo P. K. Recent developments in aptasensors for diagnostic applications // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2021. No. 13. P. 9329–9358.

3. Krasitskaya V. V. et al. The Ca^{2+}-regulated photoprotein obelin as a tool for SELEX monitoring and DNA aptamer affinity evaluation // Photochem. Photobiol. 2020. Vol. 21. P. 1041–1046.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-92

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС ПОРОСЯТ

THE INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF PLANT ORIGIN ON THE METABOLIC STATUS OF PIGLETS

Л. А. Никанова[1], В. И. Максимов[2], К. А. Березова[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л. К. Эрнста, пос. Дубровицы*
[2] *Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К. И. Скрябина*

L. A. Nikanova[1], V. I. Maksimov[2], K. A. Berezova[1]

[1] *Federal Research Center for Animal Husbandry named after Academy Member L. K. Ernst, Dubrovitsy*
[2] *Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA by K. I. Skryabin*

✉ voshaisreal@yandex.ru

Аннотация

В статье представлены результаты исследований, проведенных на двух группах поросят-отъемышей до постановки на откорм. Продолжительность эксперимента 70 дней. Контрольная группа поросят получала основной рацион, состоящий из полнорационного комбикорма, опытная группа к основному рациону получала экстракт коры лиственницы в дозировке 25 мг/кг живой массы в сутки и «Лавитол» 75 мг/кг живой массы в сутки (состоящий из 75 % арабиногалактан + 25 % дигидрокверцетин). Ввод кормовых добавок в рацион поросят оказал положительный эффект на метаболические процессы организма, в результате чего у них более полно проявился генетически обусловленный потенциал продуктивности, улучшилось клиническое состояние организма и сохранность поголовья.

Abstract

The article presents the results of studies conducted on two groups of weaned piglets before fattening. The duration of the experiment is 70 days. The control group of piglets received the main diet consisting of complete feed; the experimental group received larch bark extract at a dosage of 25 mg/kg live weight per day and Lavitol 75 mg/kg live weight per day (consisting of 75 % arabinogalactan + 25 % dihydroquercetin). The introduction of feed additives into the diet of piglets had a positive effect on the metabolic processes of the body, as a result of which their genetically determined productivity potential was more fully manifested, the clinical condition of the body and the safety of the livestock improved.

В последнее время в связи с неблагоприятными экологическими факторами, а также с факторами, связанными с интенсивными технологиями производства, возникает необходимость применения природных кормовых добавок в питании свиней. Такими кормовыми добавками могут быть антиоксиданты, пребиотики, естественные резервы которых вполне достаточны для удовлетворения значительной части потребностей в животноводстве [1].

В повышении патогенетической резистентности и формировании антиокислительной системы организма наиболее эффективными средствами являются биофлавоноиды, эталонным представителем которых является дигидрокверцетин, получаемый из древесины даурской лиственницы [2–5].

Арабиногалактан, получаемый из древесины хвойных пород, активирует метаболизм клеток, усиливает бактерицидный эффект в отношении поглощенных микроорганизмов, стимулирует антиинфекционную устойчивость организма за счет повышения функциональной активности клеток фагоцитарной системы организма [3].

Кроме того, фитоэкстракты выполняют функцию иммуномодуляторов, иммуностимуляторов и катализаторов обменных процессов [6]. Вот поэтому применение экстракта коры лиственницы в кормлении свиней вызывает большой интерес.

Целью исследования было изучение влияния экстракта лиственницы даурской в комплексе с арабиногалактаном и дигидрокверцетином на рост и развитие, состояние гомеостаза, белково-азотистый обмен и функциональное состояние печени.

Исследования проведены на свиноферме колхоза им. М. А. Гурьянова Жуковского района Калужской области, на двух группах помесных поросят (крупная белая × ландрас) в период выращивания после отъема и до постановки на откорм продолжительностью 70 суток. Поросята контрольной группы получали основной рацион, состоящий из стандартного комбикорма СК-5, поросята опытной группы к основному рациону получали экстракт

© Л. А. Никанова, В. И. Максимов, К. А. Березова, 2024

коры лиственницы 25 мг на 1 кг живой массы в сутки и «Лавитол» (арабиногалактан 75 и 25 % дигидрокверцетин) 75 мг на 1 кг живой массы в сутки.

В период исследований в контрольный и опытный период были отобраны образцы крови для определения биохимических показателей в сыворотке крови, а результаты обработаны биометрически с определением критерия достоверности Стьюдента с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

Включение «Лавитола» в комплексе с экстрактом коры лиственницы даурской в рацион поросят оказал положительное влияние на азотисто-белковый обмен. Так, в сыворотке крови у поросят, получавших экстракт коры лиственницы, содержание альбуминов было выше на 8,7 %, а глобулинов — ниже на 5,7 %, при соотношении А/Г 0,7 против 0,6 в контроле. Это обстоятельство может указывать на повышение анаболических процессов и повышенную альбуминообразовательную функцию печени, а также на иммунологическую устойчивость организма к факторам среды. Эти данные согласуются и с уровнем содержания мочевины в плазме крови, которая является конечным продуктом азотистого обмена и может характеризовать интенсивность мочевинообразовательной функции печени. Содержание мочевины в крови у поросят опытной группы было ниже на 20,9 %.

При применении в питании животных биогенных кормовых добавок важно проведение оценки функционального состояния печени, которая одна из первых реагирует на возможное токсическое действие.

В данных исследованиях комплексная кормовая добавка оказала влияние на функциональное состояние печени. При функциональной недостаточности печени, связанной с нарушением ее паренхимы, уровень общего билирубина в крови повышается. Концентрация общего билирубина в плазме крови поросят опытной группы была ниже, чем в контроле, на 33,3 %.

Изменения в метаболизме у поросят опытной группы положительно отразились на продуктивности и сохранности поголовья. Так, за период 70-дневного применения комплексной кормовой добавки валовой прирост поросят составил 34,1 кг при среднесуточном приросте 487 г против 29,1 кг и 416 г соответственно в контроле, что было выше на 17,2 %.

Таким образом, применение в кормлении (в период выращивания от отъема до постановки на откорм) комплексной кормовой добавки, содержащей экстракт коры лиственницы даурской в дозе 25 мг на 1 кг живой массы в сутки и «Лавитол» в дозе 75 мг на 1 кг живой массы в сутки, оказало положительный эффект на метаболические процессы и функциональное состояние печени, в результате чего у них более полно проявился генетически обусловленный потенциал продуктивности, улучшилось клиническое состояние организма и сохранность поголовья.

Литература

1. Овчинников А. А., Овчинникова Л. Ю., Матросян Ю. В., Еренко Е. Н. Эффективность использования в рационе телят фитоминеральной добавки и фермента // Перм. аграр. вестн. 2021. № 4. С. 134–141.

2. Максимов В. И., Пайтерова В. В. Влияние БАД «Капилар» на адаптационные возможности организма // Актуальные проблемы биологии в животноводстве: Материалы 5-й Междунар. конф., посвящ. 50-летию ВНИИФБиП (г. Боровск, 14–16 сентября 2010 г.). Боровск: ВНИИФБиП, 2010. С. 197–198

3. Никанова Л. А. Использование продуктов гидробионтов и природных кормовых добавок в профилактике нарушений обмена веществ, повышении резистентности организма и их влияние на продуктивность: дис. … д-ра биол. наук. Дубровицы, 2011. С. 178.

4. Фомичев Ю. П., Никанова Л. А., Дорожкин В. И. Дигидрокверцетин и арабиногалактан- природные биорегуляторы в жизнедеятельности человека и животных, применение в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. М.: Науч. б-ка, 2017. 702 с.

5. Фомичев Ю. П., Никанова Л. А. Природные кормовые добавки «Экостимул» и «Арабиногалактан» в экологии, продуктивном использовании животных и птицы и комбикормовой промышленности // Практ. наставление. Дубровицы, 2010. 88 с.

6. Томчук Р. И., Ладинская С. И. Приготовление и использование кормов из древесной растительности: метод. материалы. М.: Колос, 1976. С. 1–31.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-93

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

MODERN TECHNOLOGIES FOR THE EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM PLANT RAW MATERIALS

А. А. Петрова, О. В. Салищева

Кемеровский государственный университет

A. A. Petrova, O. V. Salishcheva

Kemerovo State University

✉ annapet1120@mail.ru

Аннотация

Современные методы извлечения биологически активных веществ из различного сырья ориентированы на эффективность и экологичность процесса. В работе представлена краткая характеристика биологически активных веществ, преимущества и недостатки методов экстракции и их характеристика.

Abstract

Modern methods of extracting biologically active substances from various raw materials are focused on the efficiency and environmental friendliness of the process. The brief description of biologically active substances, advantages and disadvantages of extraction methods and their characteristics were described.

В составе лекарственных средств из растений присутствует большой комплекс биологически активных веществ (БАВ), являющихся основой для обмена веществ в живых организмах. Поскольку поддержание постоянства химического состава и физических свойств организма является необходимым условием для нормального течения обменных процессов, в процессе регулирования всех жизненных функций БАВ играют ключевую роль как эффективное средство лечения и профилактики заболеваний. В результате исследований было установлено, что БАВ растительного происхождения являются вторичные метаболиты растений: алкалоиды, флавоноиды, полифенолы, дубильные вещества и др. [1].

Для извлечения БАВ из растительного сырья используют процесс экстракции. Выбор метода экстракции должен зависеть от свойств компонентов, которые необходимо извлечь и сконцентрировать [2]. Важен правильный подбор растворителя, зависящий от типа и вида растения, природы извлекаемых соединений и условий экстракции.

Современные методы экстракции включают мацерацию, экстракцию ультразвуком, экстракцию с помощью микроволн, сверхкритическую флюидную экстракцию (см. таблицу).

Сравнительная характеристика методов экстракции БАВ из растительного сырья

Метод	Преимущества	Недостатки
Мацерация	Простота, вариабельность объема экстракции	Длительность процесса, небольшой выход целевого продукта
Ультразвуковая экстракция	Разнообразие объемов экстракции, простота использования, высокая скорость процесса и низкий расход растворителя	Необходимость фильтрации, ограниченный объем, низкий выход целевого экстракта
Экстракция с помощью микроволн	Простота, высокая скорость процесса, низкий расход растворителя, возможность поддержания температуры	Высокая стоимость оборудования, небольшой объем, низкая эффективность для неполярных компонентов, не подходит для термически нестабильных компонентов
Сверхкритическая флюидная экстракция сжиженным CO_2	Высокий выход целевого продукта, гибкость параметров процесса, экологичность, стабильность при хранении, высокая скорость процесса	Высокая стоимость оборудования, не применим для экстрагирования ионных и полярных компонентов, периодичность процесса

© А. А. Петрова, О. В. Салищева, 2024

Мацерация осуществляется в условиях комнатной температуры, при этом сначала требуется залить измельченное растительное сырье необходимым количеством экстрагента. В зависимости от продолжительности процесса он может занимать от 15 до 30 мин, а также несколько дней. Вначале происходит стремительное увеличение скорости экстракции, затем она постепенно снижается, пока не будет достигнуто равновесие [3].

Для ультразвуковой экстракции предварительно высушивают растительный материал, затем измельчают и просеивают. Сырье смешивается с экстрагентом и переносится в ультразвуковой экстрактор, процесс идет на частотах, превышающих 20 кГц. Данный метод ускоряет экстракцию, более полное проникновение растворителя в растительные ткани способствует освобождению вторичных метаболитов.

Метод экстракции с помощью микроволн позволяет извлекать вещества с помощью электромагнитного излучения, частота которого составляет от 300 МГц до 300 ГГц. Извлечение происходит за счет механизма дипольного вращения и ионного переноса.

Экстракция с использованием сжиженных газов — это инновационный метод извлечения летучих и нестабильных компонентов из растительных материалов, таких как эфирные масла, фитонциды и растительные гормоны. В качестве экстрагента часто используется CO_2. Процесс происходит под высоким давлением и при температуре от 30 до 70 °С [4]. Регулирование температуры и давления позволяет осуществлять селективное извлечение путем подбора растворяющей способности сверхкритического флюида экстракции.

Способом сверхкритической CO_2-экстракции выделены биологически активные вещества из семян растения рода *Amaranthus*. Настоящая работа представляет значимость в разработках качественных отечественных продуктов пищевой и фармацевтической промышленности в связи с использованием более безопасных и эффективных технологий.

Литература

1. Lu Y. Synthesis and regulation of secondary metabolites by microRNA in medicinal plants // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2018. Vol. 43 (9). P. 1806–1811.

2. Патракова И. С., Гуринович Г. В., Салищева О. В. и др. Оценка антиоксидантной активности экстракта порошка кожуры граната // Вестн. НГАУ (Новосиб. гос. аграр. ун-т). 2024. № 4 (70). С. 253–260.

3. Мусифулина В. В. Сравнительная характеристика методов экстрагирования растительного сырья // Вестн. Инновац. Евраз. ун-та. 2021. № 4. С. 107–112.

4. Essien S. O. Recent advances in subcritical water and supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from plant materials // Trends Food Sci. Technol. 2020. Vol. 97. P. 156–169.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-94

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК ОМЕГА-3 ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ У ВЗРОСЛЫХ С ПОЛИМОРФИЗМОМ PPARG: РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ДВОЙНОЕ СЛЕПОЕ ПЛАЦЕБО-КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

EVALUATING THE IMPACT OF OMEGA-3 FATTY ACID SUPPLEMENTATION ON LIPID PROFILES IN ADULTS WITH PPARG POLYMORPHISMS

Е. А. Покушалов[1,2], А. В. Пономаренко[2,3], С. А. Байрамова[2], К. Гарсия[1], И. А. Пак[2], Е. В. Шрайнер[2], Е. Н. Воронина[3], Е. А. Соколова[3], М. Джонсон[1], Р. Миллер[1]

[1] *Triangel Scientific, Сан-Франциско, Калифорния*
[2] *Центр новых медицинских технологий, Новосибирск*
[3] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

E. A. Pokushalov[1,2], A. V. Ponomarenko[2,3], S. A. Bayramova[2], K. Garcia[1], I. A. Pak[2], E. V. Shreiner[2], E. N. Voronina[3], E. A. Sokolova[3], M. Johnson[1], R. Miller[1]

[1] *Triangel Scientific, San Francisco, California*
[2] *Center for New Medical Technologies, Novosibirsk*
[3] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ dayshadoff@gmail.com

Аннотация

Исследования показывают, что полиморфизм гена PPARG влияет на липидный обмен и сердечно-сосудистый риск, а Омега-3 жирные кислоты модулируют эти эффекты. В исследовании с 102 пациентами (ЛПНП 70–190 мг/дл) оценивалось влияние 2000 мг Омега-3 ежедневно в течение 90 дней. У пациентов с полиморфизмом PPARG в группе Омега-3 уровень ЛПНП снизился на 15,4 %, по сравнению с 2,6 % в группе плацебо ($p < 0,01$). Уровень триглицеридов снизился на 21,3 % ($p < 0,01$).

Abstract

Research shows that PPARG gene polymorphisms influence lipid metabolism and cardiovascular risk, and omega-3 fatty acids modulate these effects. A study of 102 patients (LDL 70–190 mg/dL) assessed the effects of 2000 mg Omega-3 daily for 90 days. In patients with the PPARG polymorphism, the Omega-3 group had a 15.4 % reduction in LDL cholesterol levels compared with 2.6 % in the placebo group ($p < 0.01$). Triglyceride levels decreased by 21.3 % ($p < 0.01$).

Мутации гена PPARG (гамма-рецептор, активирующий пролифератор пероксисомы), ключевого регулятора хранения жирных кислот и метаболизма глюкозы, связаны с повышенными сердечно-сосудистыми рисками [1]. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты могут улучшать сердечную функцию и снижать воспаление, уровни ТГ, что может быть полезно для пациентов с мутациями в гене PPARG [2, 3]. Омега-3 могут модулировать экспрессию PPARG, что ведет к улучшению окисления жирных кислот и транспорта холестерина, снижению уровня LDL-C и уменьшению сердечно-сосудистых рисков [4].

Объединение данных свидетельствует о том, что полиморфизм гена PPARG может влиять на липидный обмен и сердечно-сосудистый риск, при этом Омега-3 жирные кислоты, как предполагается, модулируют эти эффекты. Целью исследования является оценка влияния добавок рыбьего жира на сердечно-сосудистые маркеры у взрослых с полиморфизмом гена PPARG в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании. Группа из 102 пациентов с уровнем холестерина ЛПНП 70–190 мг/дл была рандомизирована для приема либо 2000 мг жирных кислот Омега-3, либо плацебо ежедневно в течение 90 дней. В группе Омега-3 с полиморфизмом PPARG уровень холестерина ЛПНП снизился на 15,4 % (95 % ДИ: от −19,8 до −11,0 %) по сравнению со снижением на 2,6 % в группе плацебо (95 % ДИ: от −4,1 до −1,1 %; $p < 0,01$). В группе Омега-3 без полиморфизмов PPARG уровень холестерина ЛПНП снизился на 3,7 % (рис. 1) (95 % ДИ: от −6,9 до −0,6 %), незначительно отличаясь от снижения в группе плацебо на 2,9 % (95 % ДИ: от −5,1 до −0,8 %; $p = 0,28$). Снижение уровня холестерина ЛПНП было заметно на 11,7 % выше у пациентов с полиморфизмом PPARG, чем у пациентов без него (95 % ДИ: от −19,3 до −4,0 %; $p < 0,01$).

© Е. А. Покушалов, А. В. Пономаренко, С. А. Байрамова, К. Гарсия, И. А. Пак, Е. В. Шрайнер, Е. Н. Воронина, Е. А. Соколова, М. Джонсон, Р. Миллер, 2024

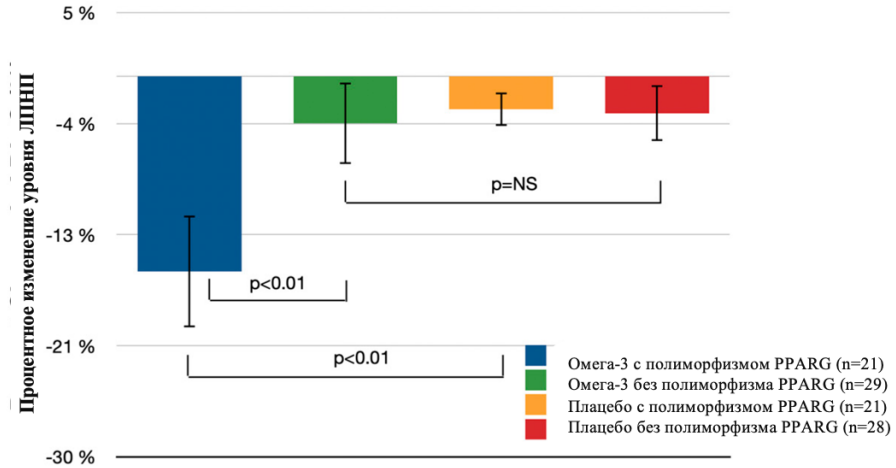


Рис. 1. Снижение уровня ЛПНП у пациентов с полиморфизмом PPARG

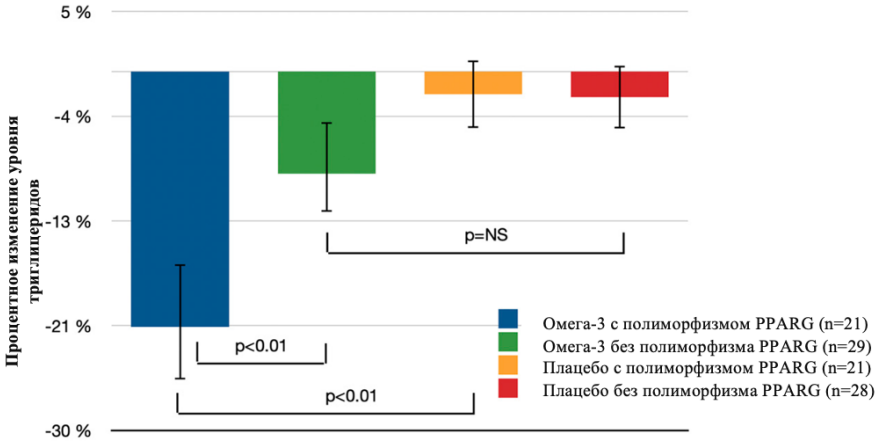


Рис. 2. Снижение уровня триглицеридов у пациентов с полиморфизмом PPARG

Уровень триглицеридов снизился на 21,3 % в группе Омега-3 с полиморфизмами PPARG (рис. 2) (95 % ДИ: от −26,5 до −16,2 %; p < 0,01), без существенных изменений уровней холестерина ЛПВП, общего холестерина или вчСРБ ни в одной группе. Частоты минорных аллелей и исходные характеристики были сопоставимы, что обеспечивало сбалансированное генетическое представительство.

Омега-3 жирные кислоты значительно снижают уровень холестерина ЛПНП и триглицеридов у носителей полиморфизма PPARG, подчеркивая потенциал генетически обусловленной персонализации сердечно-сосудистых вмешательств.

Литература

1. Song Y. Li S. He C. PPARγ Gene Polymorphisms, Metabolic Disorders, and Coronary Artery Disease // Front Cardiovasc Med. 2022. Vol. 9. 808929.

2. von Schacky C., Harris W. S. Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids // Cardiovasc Res. 2007. Vol. 73 (2). P. 310–315.

3. Bhat S., Sarkar S., Zaffar D. et al. Omega-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease and Diabetes: a Review of Recent Evidence // Curr. Cardiol. Rep. 2023. Vol. 25 (2). P. 51–65.

4. Ghasemi Darestani N., Bahrami A., Mozafarian M.R et al. Association of Polyunsaturated Fatty Acid Intake on Inflammatory Gene Expression and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis // Nutrients. 2022. Vol. 14 (21). P. 4627.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-95

ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ О-АЦЕТИЛГОМОСЕРИНСУЛЬФГИДРИЛАЗЫ В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI* *

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF O-ACETYLHOMOSERINE SULFHYDRYLASE IN *ESCHERICHIA COLI*

А. А. Привалова, Т. В. Выборная, Д. М. Бубнов, А. А. Степанова, А. А. Хозов, С. В. Молев, С. П. Синеокий

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

A. A. Privalova, T.V Vybornaya, D. M. Bubnov, A. A. Stepanova, A. A. Khozov, S. V. Molev, S. P. Sineoky

National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow

✉ melisskaasia123@yandex.ru

Аннотация

В работе представлены результаты экспрессии в клетках *E. coli* трех гетерологичных О-ацетилгомосеринсульфгидрилаз из *P. aeruginosa*, *C. violaceum*, *P. putida*, катализирующих финальную реакцию пути синтеза L-метионина. Продемонстрирована успешная биотрансформация О-ацетилгомосерина в L-метионин *in vitro*, опосредованная ферментом MetY и бактерий *P. putida*.

Abstract

The work presents the results of expression in *E. coli* cells of three heterologous O-acetylhomoserine sulfhydrylases from *P. aeruginosa*, *C. violaceum*, *P. putida* catalyzing the final reaction of the L-methionine synthesis pathway. We demonstrated the successful biotransformation of O-acetylhomoserine into L-methionine *in vitro*, mediated by the MetY enzyme and *P. putida*.

Настоящая работа посвящена разработке технологии биосинтеза L-метионина. Незаменимая аминокислота L-метионин играет ключевую роль в процессе синтеза белков, помогая поддерживать их стабильность и функциональность, используется для балансировки кормов в промышленном птицеводстве и свиноводстве, для подкормки дойных коров, а в последнее время — и в рыбоводстве. Применение синтетического DL-метионина в органическом животноводстве запрещено, поэтому биотехнологическое получение L-метионина является сегодня актуальной задачей [1].

В настоящий момент L-метионин получают двумя способами: путем химического и микробиологического синтеза. Биотехнологический способ синтеза, а именно путем культивирования таких микроорганизмов, как *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum* [2], имеет ряд значительных преимуществ перед химическим. В научной литературе показана эффективность использования двухстадийного подхода микробиологического синтеза L-метионина. Этот подход подразумевает на первой стадии биосинтез предшественника L-метионина, О-ацетилгомосерина, и его конверсию в L-метионин с помощью О-ацетилгомосеринсульфгидрилазы на второй стадии [3].

Целью представленной работы является гетерологичная экспрессия О-ацетилгомосеринсульфгидрилазы в бактериях *E. coli* и проведение реакции синтеза L-метионина из О-ацетилгомосерина с помощью этого фермента.

В работе экспрессированы гены О-ацетилгомосеринсульфгирилаз *metZ Pseudomonas aeruginosa, metY P. putida и metZ Chromobacterium violaceum в бактериях E. coli* и охарактеризована ферментативная активность продуктов этих генов. По результатам измерения ферментативной активности наиболее перспективным оказались ферменты MetY *P. putida* и MetZ *C. violaceum*. Для этих ферментов определены температурные и pH-оптимумы и подобраны условия для длительного хранения. Установлено, что О-ацетилгомосерин-сульфгидрилаза, полученная из *P. Putida*, обладает более высокой ферментативной активностью по сравнению *C. violaceum*, 44 ± 2 (55 °C и pH 7,5) против 12 ± ед/мг общего белка (45 °C и pH 7,0), соответственно.

Для фермента MetY из *P. putida* была исследована устойчивость к ингибированию L-метионином. При увеличении содержания L-метионина 50 г/л фермент сохраняет активность на уровне 12 %, что позволяет считать возможным разработать технологию конверсии, при которой L-метионин синтезируется в концентрации 50 г/л и выше.

* Исследование выполнено в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» и при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ (№ 075-15- 2019-1659).

© А. А. Привалова, Т. В. Выборная, Д. М. Бубнов, А. А. Степанова, А. А. Хозов, С. В. Молев, С.П., Синеокий, 2024

Заключительным этапом работы была успешно продемонстрирована биотрансформация *in vitro* О-ацетилгомосерина в L-метионин в присутствии метантиола, опосредованная ферментом MetY и бактерий *Pseudomonas putida*. Конверсия трансформации составила 40 % масс.

Ожидается, что благодаря отечественной разработке технология синтеза L-метионина в обозримом будущем станет конкурентоспособной по сравнению с химическим синтезом аминокислоты и с мощностью, достаточной для импортозамещения на российском рынке.

Литература

1. Лившиц В. А., Бубнов Д. М., Шустикова Т. Е. и др. Перспективы получения L-метионина с использованием биотехнологических методов на основе *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum*. Ч. 1. Применение, методы получения L-метионина и регуляция его биосинтеза у бактерий // Биотехнология. 2023. Т. 39, № 4. С. 3–28.

2. Shiozaki T., Inoue G. Process for producing methionine // Patent Application US20070055078 A1, C07C 323/25, publ. 2007.

3. Kim S., Cho K., Shin Y. et al. Microorganism producing L-methionine precursor and method of producing L-methionine and organic acid from the L-methionine precursor // Patent Appl. WO2008013432 A1, C12P 13/12, publ. 2008.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-96

ХАРАКТЕРИСТИКА ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИОЦИТОВ КАК ОСНОВА *IN VITRO* МОДЕЛИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА *

CHARACTERISATION OF FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES AS THE BASIS OF AN *IN VITRO* MODEL FOR TESTING DRUGS FOR RHEUMATOID ARTHRITIS THERAPY

Д. В. Риппинен, А. О. Соловьева

НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск

D. V. Rippinen, A. O. Solovieva

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk

✉ d.rippinen@g.nsu.ru

Аннотация

Ревматоидный артрит (РА) — аутоиммунное заболевание, распространенность и социальная значимость которого крайне высока. На сегодняшний день идет активный поиск эффективных таргетных препаратов и релевантных *in vitro* тест-систем. В работе проведена сравнительная характеристика линий фибробластоподобных синовиоцитов, выделенных от пациентов с РА. Проанализирована скорость их миграции, секреция цитокинов, ответ на воздействие провоспалительных цитокинов.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease, the prevalence and social significance of which is extremely high. To date, there is an active search for effective targeting drugs and relevant *in vitro* test systems. In this work we have carried out a comparative characterisation of fibroblast-like synoviocyte lines isolated from patients with RA. Their migration rate, cytokine secretion, and response to proinflammatory cytokines were analysed.

Качественная оценка новых терапевтических препаратов во многом зависит от используемой *in vitro* тест-системы, поэтому подбор модели, отражающей патогенез целевой патологии является важным этапом фармразработки. Ревматоидный артрит (РА) включает сложную сеть взаимодействия различных цитокинов и клеточных элементов, которые запускают воспалительную клеточную инфильтрацию, синовиальную гиперплазию, повреждение хряща и разрушение костной ткани [1]. Участие цитокинов занимает центральное место в патогенезе РА, основными игроками признаны: ФНО-α, IL-6, IL-7, IL-21, IL-23, GM-CSF, IL-1β, IL-18, IL-33 и IL-2, высокие концентрации которых характерны для синовиальной жидкости при РА.

Лечение РА в основном связано с использованием модифицирующих заболевание противоревматических антицитокиновых препаратов на основе моноклональных антител (МАТ). Несмотря на большое разнообразие существующих препаратов, активно продолжается поиск эффективных агентов, причем помимо МАТ исследуются препараты на основе ДНК- и РНК-аптамеров, которые лишены недостатков препаратов белковой природы. В связи с этим актуальным является разработка релевантных *in vitro* моделей для тестирования антиревматических препаратов.

В патогенезе РА ведущую роль играют фибробластоподобные синовиоциты (ФПС), характеризующиеся эпигенетически импринтированным агрессивным ростом и являющиеся главной мишенью для терапии данного заболевания, а соответственно, и основой для тестирования антиревматических препаратов. ФПС обладают инвазивностью, высокой миграционной активностью и продукцией провоспалительных цитокинов, включая IL-1, IL-6 и ФНО-а, MMPs, агреканазы, молекулы адгезии [2–4].

Были выделены ФПС из синовиальной оболочки (СО) и синовиальной жидкости (СЖ) пациентов с диагнозом РА. В качестве контроля использовался биоматериал от пациентов без РА. Все полученные клеточные линии были проанализированы на миграционную активность, экспрессию IL-6, в том числе индукцию ФНО, митохондриальную активность, а также проведено иммунофенотипирование по стандартным маркерам мезенхимальных клеток.

Иммунофенотип выделенных клеток: $CD45^{-}44^{+}73^{+}90^{+}$. Базовая секреция ФНО-а ФПС статистически не отличалась между клеточными линиями $РА^{-}$ (0,2 ± 0,01 пг/мл) и $РА^{+}$ (0,18 ± 0,01 пг/мл). В качестве контроля исполь-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (номер темы FWNR-2022-0009).

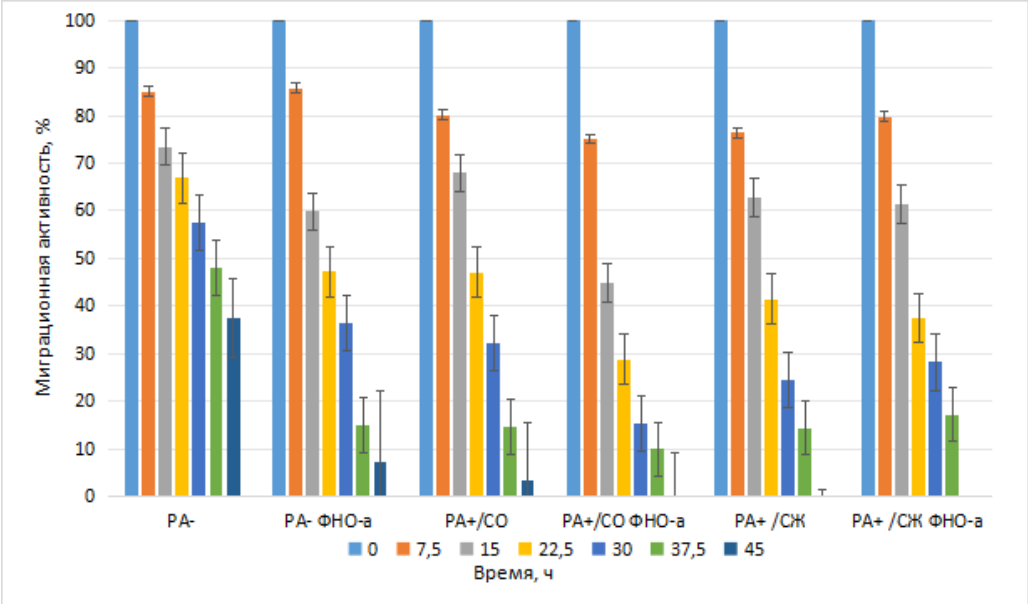
© Д. В. Риппинен, А. О. Соловьева, 2024

зовалась модельная культура MRC-5 (нормальные фибробласты человека), которая продемонстрировала низкие значения экспрессии ФНО (0,04 пг/мл).

Через 2 ч после добавления СЖ к ФПС РА⁺/СО отличаются повышенной митохондриальной активностью на 52 ± 32,9 % и 20 ± 33 % при добавлении ФНО. После 48 ч происходит ингибирование митохондриальной активности на 40 % при добавлении как ФНО, так и СЖ. У ФПС РА⁺/СЖ отмечена повышенная митохондриальная активность после кратковременного воздействия СЖ (24 ч) на 74 ± 0,23 % без активации через 2 ч. ФНО не повлияло на митохондриальную активность ФПС РА⁺/СЖ.

Добавление СЖ стимулировало все исследуемые ФПС повышение секреции IL-6 (до 390,287 пг/мл). При стимулировании ФНО регистрировалось планомерное повышение IL-6 в течение 48 ч (8,4 пг/мл — базовая секреция, до 447,3 пг/мл стимулированная) ФПС РА⁺/СО. Линия ФПС РА⁺/СЖ не отреагировала на добавление ФНО-а повышением уровня секреции IL-6.

Было показано, что наибольшей базовой пролиферативной и миграционной активностью характеризуются образцы ФП РА⁺/СЖ. Однако данная клеточная линия не имела отличий при ее стимуляции ФНО-а. Образцы ФПС РА⁺/СО положительно реагировали на влияние ФНО-а, таким образом миграционная активность была выше, чем в образце с контролем (см. рисунок).



Миграционная активность ФПС: РА⁻ — ФПС без ревматоидного артрита; РА⁻ ФНО-а — ФПС без ревматоидного артрита с добавлением ФНО-а; РА⁺/СО — ФПС от пациента с РА, выделенные из синовиальной оболочки; РА⁺/СО ФНО-а — ФПС от пациента с РА, выделенные из синовиальной оболочки с добавлением ФНО; РА⁺/СЖ — ФПС от пациента с РА, выделенные из синовиальной жидкости; РА⁺/СЖ ФНО-а — ФПС от пациента с РА, выделенные из синовиальной жидкости с добавлением ФНО

В результате исследования были проанализированы клеточные линии, полученные от пациентов с РА (пунктат СЖ и операционный материал синовиальной оболочки). Таким образом, отмечается, что не все ФПС реагируют на ФНО, поэтому при тестировании анти ФНО препаратов (МАТ, аптамеры) необходимо тестировать ФПС РА⁺ по чувствительности к ФНО.

Литература

1. Sobh M. M., Abdalbary M., Elnagar S. et al. Secondary osteoporosis and metabolic bone diseases // J. Clin. Med. 2022.

2. Jiang H., Zhang Z., Yu Y. et al. Drug Discovery of DKK1 Inhibitors // Front Pharmacol. 2022.

3. Niu Yuting. Aptamer-immobilized bone-targeting nanoparticles in situ reduce sclerostin for osteoporosis treatment // Nano Today. 2022. Vol. 45. P. 101529.

4. Pap T., Korb-Pap A. Cartilage Damage in Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis-Two Unequal Siblings // Nat. Rev. Rheumatology. 2023. No. 11. P. 606–615.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-97

ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДОВ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА В СНИЖЕНИИ СМЕРТНОСТИ ТРУДОСПОСОБНОГО НАСЕЛЕНИЯ РФ ОТ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

PERSPECTIVES OF AI METHODS IN DECREASING DEATHS RATE OF THE RUSSIAN WORKING POPULATION FROM CARDIOVASCULAR DISEASES

Д. С. Русина[1], Н. В. Вареха[1], Р. Р. Гимадиев[1,2], О. Б. Щеголев[2], К. А. Варакина-Митрай[2], В. О. Димитров[3]

[1]Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва
[2]Институт лабораторной медицины, Москва
[3]ООО «РТК-элемент», Москва

D. S. Rusina[1], N. V. Varekha[1], R. R. Gimadiev[1,2], O. B. Schegolev[2], K. A. Varakina-Mitrail[2], V. O. Dimitrov[3]

[1]Peoples' Friendship University of Russia named after P. Lumumba, Moscow
[2]Institute of Laboratory Medicine, Moscow
[3]RTK-element, LLC, Moscow

✉ darya.rusina22@gmail.com

Аннотация

Согласно данным Росстата, сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущей причиной смертности в Российской Федерации, особенно среди мужчин трудоспособного возраста, у которых показатели смертности существенно выше, чем у женщин. Частично это несоответствие можно объяснить защитным действием женских половых гормонов. Между тем профилактическая медицинская практика в России развита недостаточно: лишь 35,3 % граждан ежегодно проходят медицинские осмотры. В этой статье утверждается, что использование искусственного интеллекта для прогнозирования значений показателей липидного профиля может выявить группы высокого риска и в конечном итоге снизить сердечно-сосудистую смертность.

Abstract

According to Rosstat, cardiovascular disease (CVD) remains the leading cause of mortality in the Russian Federation, particularly among men of productive age, who exhibit significantly higher mortality rates compared to women. This discrepancy may be partially attributed to the protective effects of female sex hormones. Meanwhile, preventive healthcare practices in Russia are underdeveloped, as evidenced by only 35.3 % of citizens participating in annual health checkups. This paper argues that leveraging artificial intelligence (AI) to predict lipid profile values can identify high-risk populations and ultimately reduce cardiovascular mortality.

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире, а в РФ на них приходится значительная доля смертей, особенно среди мужчин. Всемирная организация здравоохранения (2021 г.) сообщила, что ССЗ являются причиной более 35 % всех смертей в России. Факторы, способствующие этой ситуации, включают нездоровый образ жизни, социально-экономические условия и отсутствие эффективных стратегий общественного здравоохранения, особенно в профилактической медицине.

Исследования показывают, что мужчины непропорционально чаще страдают от ССЗ, при этом уровень смертности в пять раз выше, чем у женщин [1]. Гормональные различия играют решающую роль в этом гендерном неравенстве. Эстроген, женский половой гормон, проявляет защитные свойства при ССЗ, в том числе благоприятно влияет на липидный профиль [2]. Понимание этих различий имеет решающее значение для разработки профилактических стратегий, которые могут устранить конкретные факторы риска, связанные с мужским населением.

Проблемы в профилактической медицине в России

Несмотря на значительное бремя ССЗ, профилактическая медицина в России остается недостаточной. Низкий уровень ежегодных осмотров (35,3 %) свидетельствует о недостаточной информированности и недостаточной вовлеченности в профилактическую медико-санитарную помощь [3]. Это дает возможность внедрить технологические решения для расширения участия в профилактических стратегиях, позволяя системе здравоохранения более эффективно выявлять лиц, подвергающихся риску.

© Д. С. Русина, Н. В. Вареха, Р. Р. Гимадиев, О. Б. Щеголев, К. А. Варакина-Митрай, В. О. Димитров, 2024

Искусственный интеллект в превентивной медицине

Искусственный интеллект (ИИ) может произвести революцию в сфере здравоохранения посредством моделей регрессии и классификаций. Алгоритмы искусственного интеллекта могут анализировать обширные наборы данных для прогнозирования концентраций липидного профиля, включая уровни липопротеинов низкой плотности, липопротеинов высокой плотности и триглицеридов. С помощью методов машинного обучения эти инструменты могут выявлять людей из группы риска на основе факторов образа жизни, генетической предрасположенности и других соответствующих данных о состоянии здоровья [4].

Интеграция ИИ в прогнозирование липидных профилей может дать важную информацию о стратификации сердечно-сосудистого риска. Различные исследования продемонстрировали точность этих технологий. Например, исследователи [5] предсказали, что в недалеком будущем модели ИИ смогут точно предсказывать нарушения в липидном обмене с высокой чувствительностью и специфичностью, что позволит проводить целевые вмешательства для людей с повышенным риском ишемических заболеваний.

Выявляя группы высокого риска на ранней стадии, медицинские работники могут раньше инициировать программы модификации образа жизни и фармакологические вмешательства, потенциально снижая как заболеваемость, так и смертность, связанную с ССЗ [6]. Более того, в дополнение к этим технологическим достижениям потребуются образовательные кампании, направленные на повышение осведомленности о важности регулярных осмотров и активного участия в здравоохранении.

Несмотря на потенциальные преимущества, успешной интеграции инструментов ИИ в российскую систему здравоохранения препятствует ряд причин. К ним относятся ограничения технологической инфраструктуры, необходимость обучения медицинских работников использованию ИИ и потенциальное сопротивление изменениям внутри медицинского сообщества [7]. Заинтересованные стороны должны работать сообща для решения этих проблем посредством инвестиций в инфраструктуру и обучение.

Заключение

ССЗ продолжают представлять значительную угрозу здоровью населения в РФ, особенно среди мужчин трудоспособного возраста. Недостаточное внедрение методов превентивной медицины усугубляет эту проблему. Однако внедрение технологий ИИ для прогнозирования липидного профиля представляет собой многообещающее направление для выявления групп высокого риска и усиления профилактических мер. Внедрение этих подходов, наряду с эффективной политикой общественного здравоохранения, может помочь в ранней диагностике и лечении пациентов с сердечно-сосудистой патологией и улучшить показатели здоровья в России.

Литература

1. Iakunchykova O., Averina M., Wilsgaard T. et al. What factors explain the much higher diabetes prevalence in Russia compared with Norway? Major sex differences in the contribution of adiposity // BMJ Open Diabetes Res. Care. 2021. Vol. 9 (1). e002021.

2. Bancks M. P., Akhabue E., Rana J. S., Reis J. P. et al. Sex differences in cardiovascular risk factors before and after the development of type 2 diabetes and risk for incident cardiovascular disease // Diabetes Res. Clin. Practice. 2020. Vol. 166. P. 108334.

3. Савин С. Д., Смирнова А. Н. Профилактическая медицина в России: проблема общественного (не)доверия // Вестн. С.-Петерб. университета. Социология. 2022. Т. 15, вып. 4. С. 405–423.

4. Chiarito M., Luceri L., Oliva A. et al. Artificial Intelligence and Cardiovascular Risk Prediction: All That Glitters is not Gold // Eur. Cardiology. 2022. Vol. 17. e29.

5. Javaid A., Zghyer F., Kim C., Spaulding E. M. et al. Medicine 2032: The future of cardiovascular disease prevention with machine learning and digital health technology // Am. J. Preventive Cardiology. 2022. Vol. 12. P. 100379.

6. Rethemiotaki I. Global prevalence of cardiovascular diseases by gender and age during 2010–2019 // Arch. Med. Sci. Atherosclerotic Diseases. 2023. Vol. 8. P. e196–e205.

7. Ahmed M. I., Spooner B., Isherwood J. et al. A Systematic Review of the Barriers to the Implementation of Artificial Intelligence in Healthcare // Cureus. 2023. Vol. 15 (10). P. e46454.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-98

ДОСТАВКА ГЕНОВ ТЕТРАМЕРИЗОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ПОМОЩИ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ИНДУКЦИИ ЗАЩИТЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА А И ВИРУСА SARS-COV-2

DELIVERY OF TETRAMERIZED SINGLE-DOMAIN ANTIBODY GENES USING A RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRAL VECTOR TO INDUCE PROTECTION AGAINST INFLUENZA A VIRUS AND SARS-COV-2 VIRUS

Е. И. Рябова[1,2], А. А. Деркаев[1], М. А. Довгий[1], Д. В. Воронина[1], А. А. Блинов[1,3], А. С. Вансович[1], Р. М. Хоссаин[1], И. А. Фаворская[1], Д. В. Щебляков[1], И. Б. Есмагамбетов[1]

[1] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва
[2] Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина
[3] Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, Москва

E. I. Ryabova[1,2], A. A. Derkaev[1], M. A. Dovgiy[1], D. V. Voronina[1], A. A. Blinov[1,3], A. S. Vansovich[1], R. M. Khosain[1], I. A. Favorskaya[1], D. V. Shcheblyakov[1], I. B. Esmagambetov[1]

[1] Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow
[2] Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA by K. I. Skryabin
[3] Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow

✉ryabovaei96@gmail.com

Аннотация

Вирусы гриппа А и SARS-CoV-2 продолжают представлять серьезную угрозу для здравоохранения. В нашей работе получен рекомбинантный аденоассоциированный вирусный вектор, экспрессирующий ген тетрамеризованных однодоменных антител, специфичных к различным вариантам вируса SARS-CoV-2 и вирусам гриппа А. Показано, что однократное внутримышечное введение полученного вектора обеспечивает защиту от инфекции гриппа А и COVID-19 в профилактическом режиме.

Abstract

Influenza A and SARS-CoV-2 viruses continue to pose a serious threat to public health. In our study we obtained a recombinant adeno-associated viral vector expressing the gene of tetramerized single-domain antibodies specific to various variants of the SARS-CoV-2 virus and influenza A viruses. It was shown that a single intramuscular administration of the obtained vector provides protection against influenza A infection and COVID-19 in a prophylactic mode.

Введение

Несмотря на значительный прогресс в разработке терапевтических и профилактических средств, вирусы гриппа А и SARS-CoV-2 продолжают представлять серьезную угрозу для глобального здравоохранения. Вакцинация, дополненная противовирусными препаратами, является основным способом контроля распространения гриппа и COVID-19. Однако вакцинация групп людей с иммунодефицитными состояниями не обеспечивает эффективного иммунного ответа.

Одним из перспективных направлений в разработке противовирусных препаратов является создание моноклональных антител, нацеленных на высококонсервативные участки вирусных белков. Среди таких антител выделяются однодоменные антитела семейства верблюдовых, которые благодаря длинным петлям CDR3 способны связываться с труднодоступными эпитопами вирусных антигенов. Однако их недостатком является ограниченное время циркуляции в организме, что делает их неподходящими для длительной профилактики инфекций. Решением проблемы может стать альтернативный способ пассивной иммунизации с применением аденоассоциированного вирусного вектора (rAAV), обеспечивающего доставку и продолжительную экспрессию в организме генов антител заданной специфичности. Существуют данные об успешном применении такого подхода для индукции длительной защиты против ВИЧ, вируса Эболы, вируса гриппа, вируса SARS-CoV-2, а также для интоксикации

© Е. И. Рябова, А. А. Деркаев, М. А. Довгий, Д. В. Воронина, А. А. Блинов, А. С. Вансович, Р. М. Хоссаин, И. А. Фаворская, Д. В. Щебляков, И. Б. Есмагамбетов, 2024

ботулотоксином типа A [1–3]. В настоящей работе нами была изучена возможность индукции защиты от инфекции, вызванной вирусами гриппа A и SARS-CoV-2, при помощи доставки и длительной экспрессии генов тетрамеризованных однодоменных антител в составе rAAV.

Результаты

Однодоменные антитела, специфичные к RBD S белка вируса SARS-CoV-2, а также однодоменные антитела к гемагглютинину вируса гриппа A, обладающие вируснейтрализующей активностью, были получены, как описано ранее [4, 5]. Тетрамеризованные антитела получали при помощи соединения 4 однодоменных антител через глицин-сериновый линкер, где 2 однодоменных антитела специфичны к различным вариантам вируса SARS-CoV-2 и 2 однодоменных антитела — к вирусам гриппа A. Дополнительно полученную конструкцию модифицировали с N-конца сигнальным пептидом и с C-конца — Fc-фрагментом IgG1 человека. Далее, генетическую конструкцию, кодирующую тетрамеризованное антитело, клонировали в плазмидную систему rAAV-DJ (Cell Biolabs, США). Рекомбинантный аденоассоциированный вирус rAAV-Tetra, несущий генетическую конструкцию, экспрессирующую тетрамеризованные однодоменные антитела, получали при помощи трансфекции клеток HEK293. Очистку rAAV-Tetra проводили при помощи тангенциальной фильтрации и аффинной хроматографии.

Защитную активность rAAV-Tetra против COVID-19 оценивали с использованием модели летальной инфекции ACE-2 трансгенных мышей вирусом SARS-CoV-2 варианта B.1.1.1 (hCoV19/Russia/Moscow_PMVL-1/2020). В результате серий экспериментов было показано, что однократное внутримышечное введение препарата в дозе 10^{11} гк/животное (5×10^{12} гк/кг) обеспечивает 100 % защиту животных через 14 дней после введения. Протективную активность rAAV-Tetra против вируса гриппа A оценивали на модели летальной инфекции мышей линии BALB/c. В работе использовали вирус гриппа A/California/04/2009 (H1N1), адаптированный для мышей. В результате серии экспериментов было показано, что доза 10^{11} гк/животное (5×10^{12} гк/кг) rAAV-Tetra способна обеспечивать защиту животных от вируса гриппа A в профилактическом режиме спустя 60 дней после однократного внутримышечного введения.

Таким образом, в нашей работе была продемонстрирована принципиальная возможность применения препарата rAAV для доставки гена тетрамеризованного однодоменного антитела и индукции защиты от инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 и вирусом гриппа A.

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. 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.

4. 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. Vol. 13. P. 822159.

5. Щебляков Д.В., Воронина Д.В., Фаворская И.А. и др. Наноантитело широкого спектра к гемагглютинину вируса гриппа A подтипа H3 // Acta Naturae. 2024. Т. 16, № 1. С. 101–110.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-99

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОДИФИКАЦИИ ХИТОЗАНА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОМЕДИЦИНЕ

PROSPECT DIRECTIONS FOR MODIFICATION OF CHITOSAN AND ITS APPLYING IN BIOMEDICINE

О. С. Сазонова, И. А. Архипов

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

O. S. Sazonova, I. A. Arkhipov

Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

✉ mirno4i@bk.ru

Аннотация

В работе основное внимание уделено рассмотрению приоритетных направлений исследования хитозана в биомедицине и фармацевтической промышленности. Были изучены литературные и патентные данных для проведения информационно-аналитического анализа существующих модификаций структуры хитозана для его применения в биомедицине и фармации.

Abstract

This article provided great attention to consideration of priority areas Chitosan research in biomedicine and pharmaceutical industry. Literature and patent data were studied to conduct an information and analytical analysis of existing modifications of the structure of chitosan for its use in biomedicine and pharmacy.

Хитин — строительный материал животного происхождения, занимающий второе место (после целлюлозы) по распространению в природе. Хитин представляет собой b-1,4-гомополимер N-ацетилглюкозамина [1].

В настоящее время известно более 70 направлений использования хитина и хитозана в различных сферах жизнедеятельности человека [2]. Наиболее важными среди них являются следующие: биомедицина, фармацевтическая промышленность. Хитозан применяется в составе лечебных препаратов, мазей, раневых покрытий и для изготовления хирургических нитей. За рубежом представлены искусственные сосуды из хитозана в качестве среды (проводника) для сращивания нервных волокон, а также катетеры, волокна и оболочки из хитозана [3]. Хитозан и его производные могут иметь потенциальную ценность как нейропротекторные агенты [4].

В связи с особым распространением использования хитозана возникает интерес в изучении полезных в биомедицине модификаций хитозана с целью повышения уровня физико-механических характеристик полимера. Например, повышение молекулярной массы хитозана, снижение кристалличности его структуры, повышение пластичности и эластичности материалов.

В настоящее время определились 3 основных направления модификации хитозана: реакции полимераналогичных превращений с участием функциональных групп полисахарида [5], реакции привитой и блок-сополимеризации с синтетическими мономерами [6, 7] и получение смесевых композиций с природными и синтетическими полимерами [8]. Привитая полимеризация различных мономеров на гидроксильные и аминогруппы основной цепи хитозана позволяет получать сополимеры, отличающиеся строением, степенью разветвленности и с разным содержанием немодифицированных аминогрупп полисахарида [9].

Привитая радикальная полимеризация виниловых мономеров на хитозан открывает возможности получать гибридные сополимеры, сочетающие высокие физико-механические характеристики синтетического полимера и природного катионита — адгезия к слизистым оболочкам, адсорбция биофармацевтических препаратов [10]. Этот вид сополимеров нашел особое применение в биомедицине как гидрогель. Применение гидрогелевых раневых повязок позволяет создавать защитную оболочку на поверхности ран, пролонгированно доставлять к ним антибактериальные агенты, пептиды и другие активные вещества, что существенно повышает эффективность их лечения [11].

Синтез привитых сополимеров хитозана осуществляют двумя путями: методом поликонденсации и методом свободнорадикальной полимеризации. Такие синтезы позволяют получать биосовместимые и биоразла-

© О. С. Сазонова, И. А. Архипов, 2024

гаемые ранозаживляющие материалы и импланты, а также системы направленной доставки лекарств [12, 13]. Первичные гидроксильные и аминогруппы, расположенные на основной цепи хитозана, позволяют осуществлять химическую модификацию для контроля его физических свойств. Когда гидрофобный фрагмент конъюгируется с молекулой хитозана, полученный амфифил может образовывать самоорганизующиеся наночастицы, которые могут инкапсулировать определенное количество лекарств и доставлять их к определенному месту действия [14].

Таким образом, синтезированные сополимеры могут быть использованы для формирования мицелл с гидрофобными ядрами, которые применяли для инкапсулирования лекарственных препаратов [15].

Привитые сополимеры N-винилпирролидона и аллилхитозана со степенями замещения по аллильным группам 0,30 и 0,42 обладали антимикробной активностью, материалы на их основе имели хорошее соотношение водопоглощение/водоотдача и предотвращали бактериальное заражение [16].

Сополимер диальдегидцеллюлозы и хитозана также используют в качестве бактерицидного действия и вовлекают в состав раневых повязок [17, 18]. Блок-сополимеры хитозана с D,L-лактидом обладают бактерицидными свойствами и имеют потенциал в изготовлении раневых повязок, обеззараживающих средств и т. д. [19].

Проведенный анализ современных исследований демонстрирует перспективность использования ряда модификаций хитозана в медико-биологических и фармакологических практиках.

Литература

1. Мезенова О. Я., Лысова А. С., Григорьева Е. В. Получение и применение хитина и его производных в технологи и пищевых продуктов // Научные основы и практическая реализация технологий получения и применения натуральных структуробразователей: Межд. науч.-практ. конф. (24–25 мая): тез. докл. Краснодар: КубГТУ, 2002. С. 203–206.

2. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / под ред. К. Г. Скрябина, Г. А. Вихоре-вой, В. П. Варламова. М.: Наука, 2002. 368 с.

3. Савченко И. В. Обзор приложений хитозана в медицине и в технологии биоотображения // Вестн. науки. 2023. Т. 1, № 6 (63). С. 1240–1254.

4. Zhang X., Liang S., Gao X. et al. Protective Effect of Chitosan Oligosaccharide against Hydrogen Peroxide-Mediated Oxidative Damage and Cell Apoptosis via Activating Nrf2/ARE Signaling Pathway // Neurotox. Res. 2021. Vol. 39 (6). P. 1708–1720.

5. Balan V., Verestiuc L. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review // Eur. Polym. J. 2014. Vol. 53. P. 171.

6. Zohuriaan-Mehr M. J. Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: a comprehensive review // Iran Polym. J. 2005. Vol. 14. P. 235.

7. Jenkins D. W., Hudson S. M. Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radical-based reactions and illustrated with chitin/chitosan trunk polymers // Chem. Rev. 2001. Vol. 101. P. 3245.

8. Хитозан: сб. ст. / под ред. К. Г. Скрябина, С. Н. Михайлова, В. П. Варламова. М.: Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. 593 с.

9. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications // Prog. Polym. Sci. 2006. Vol. 31. P. 603.

10. Jia Z., Shen D., Xu W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan // Carbohydr. Res. 2001. Vol. 333, No. 1. P. 1.

11. Abilova G. et al. Chitosan based hydrogels and their use in medicine // Chem. Bull. Kazakh Natl. Univ. 2020. Vol. 97. P. 16–28.

12. Sokolsky-Papkov M., Agashi K., Olaye A. et al. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. Vol. 59. P. 187.

13. Woodruff M. A., Hutmacher D. W. The return of a forgotten polymer — polycaprolactone in the 21stcentury // Prog. Polym. Sci. 2010. Vol. 35. P. 1217.

14. Patel M. P., Patel R. R., Patel J. K. Chitosan mediated targeted drug delivery system: a review // J. Pharm. Pharm. Sci. 2010. Vol. 13 (4). P. 536–557.

15. Duan K., Zhang X., Tang X. et al. Fabrication of cationic nanomicelle from chitosan-graftpolycaprolactone as the carrier of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2010. Vol. 76. P. 475.

16. Yazdani-Pedram M., Retuert J. Homogeneous grafting reaction of vinyl pyrrolidone onto chitosan // J. Appl. Polym. Sci. 1997. Vol. 63. P. 1321.

17. Белов А. А., Белова Е. Н., Филатов В. Н. Текстильные материалы, содержащие хитозан и протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба, для медицинских целей // Биомед. химия. 2009. Т. 55, № 1. С. 61–67.

18. Белов А. А. и др. Новые текстильные перевязочные материалы на основе биодеградируемых полимеров, содержащих протеиназы, для лечения ран и ожогов // Раны и раневые инфекции. Журн. им. проф. Б. М. Костюченка. 2018. Т. 5, № 1. С. 16–26.

19. Силина Н. Е. и др. Получение блок-сополимеров хитозана и D, L-лактида под действием ультразвука. Структура и свойства // Высокомолекулярные соединения. Сер. Б. 2017. Т. 59, № 5. С. 355–364.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-100

ИЗУЧЕНИЕ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ГРАНУЛИРОВАННЫМ АЭРОБНЫМ ИЛОМ В РЕАКТОРЕ ОТЪЕМНО-ДОЛИВНОГО ТИПА

STUDY OF WASTEWATER TREATMENT FROM THE PROCESS OF CULTIVATING METHANE-OXIDIZING MICROORGANISMS USING GRANULAR AEROBIC SLUDGE IN SBR

Д. И. Сакаян[1], С. В. Калёнов[1], Н. С. Хохлачев[1], К. С. Романовская[2]

[1]Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва
[2]Институт экологии, Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва

D. I. Sakayan[1], S. V. Kalenov[1], N. S. Khokhlachev[1], K. S. Romanovskaya[2]

[1]Mendeleev University of Chemical Technology, Moscow
[2]Institute of Environmental Engineering, Peoples Friendship University of Russia, Moscow

✉ sakayandaniil@gmail.com

Аннотация

Проведены исследования эффективности очистки модельных сточных вод и сточных вод процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов. Отмечены проблемы очистки сточных вод процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов, связанные с несбалансированным составом по основным биогенным элементам и неоптимальными значениями pH для процессов нитрификации и денитрификации, высокими концентрациями тяжелых металлов.

Abstract

Studies have been carried out on the efficiency of purification of model wastewater and wastewater from the process of cultivating methane-oxidizing microorganisms. Problems of wastewater treatment from the process of cultivating methane-oxidizing microorganisms are noted, associated with an unbalanced composition of the main nutrients and suboptimal pH values for the processes of nitrification and denitrification, and high concentrations of heavy metals.

Исследование культивирования метанокисляющих микроорганизмов и состава образуемых сточных вод

Для наработки данных о составе сточных вод проводилось непрерывное культивирование в лабораторном ферментере общим объемом 10 л при начальном заполнении питательной средой в 6 л в проточном режиме со скоростью протока до 0,35 $ч^{-1}$ при атмосферном давлении, термостатировании 41,5 °С и поддержании pH 5,6–5,8. В начальной стадии культивирования соотношение метан-воздушной смеси составляло 1 : 1 при расходах 0,5 л/мин и оборотах мешалки 550 об./мин. При выходе на заданную производительность расход метан-воздушной смеси составил 6 л/мин при соотношении 1 : 3, а обороты мешалки достигали 850 об./мин. Проточное культивирование осуществлялось при концентрации биомассы, равной 7–8 г/л, в течение 180 дней. На рис. 1 представлены усредненные результаты изменения оптической плотности сообщества метанокисляющих микроорганизмов, где выделенные зоны показывают стабильный процесс культивирования, при котором измерялись основные аналитические показатели загрязняющих веществ образуемых сточных вод на стадии сепарации.

С 27-го по 69-й день культивирования (1-я зона) усредненное значение ХПК составило 145,2 мг O_2/л при средней концентрации биомассы 7,14 г/л, с 97-го по 180-й день культивирования (2-я зона) усредненное ХПК составило 152,4 мг O_2/л при 7,46 г/л. Также была отмечена корреляция ХПК в сточных водах с концентрацией биомассы метанокисляющих микроорганизмов, при которой с увеличением ОП увеличивается значение ХПК, т. е. при концентрации биомассы метанокисляющих микроорганизмов 1 г/л ХПК составило в среднем 20,43 мг O_2/л (табл. 1).

Таблица 1

Усредненные показатели ХПК при различных концентрациях биомассы

АСВ, г/л	1	2	3	4	5	6	7	8
ХПК, мг O_2/л	20,43	43,21	64,16	78,56	104,78	117,84	142,32	160,67

© Д. И. Сакаян, С. В. Калёнов, Н. С. Хохлачев, К. С. Романовская, 2024

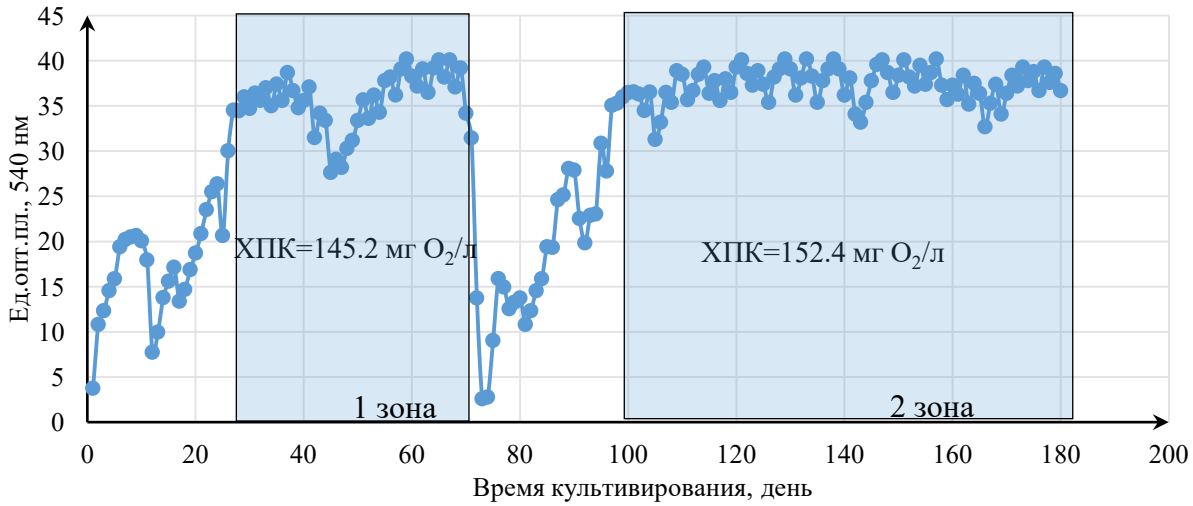


Рис. 1. Изменение оптической плотности в ходе культивирования метанокисляющих микроорганизмов

При нестабильном процессе с 69-го по 74-й день культивирования происходило резкое увеличение ХПК до 195 мг O_2/л, что связано с неоптимальными условиями для культивирования, из-за которых возможно происходило выделение в среду большего количества метаболитов или продуктов лизиса клеток. Во время проведения культивирования, 2 раза в неделю измерялись аналитические показания сточных вод по ХПК, $БПК_5$, NH_4^+, PO_4^{3-}, образуемых после сепарации культуральной жидкости от биомассы микроорганизмов на центрифуге при 3500 об./мин. Таким образом, усредненная сточная вода с процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов в диапазоне концентрации биомассы, равной 7–8 г/л, имеет характеристику, представленную в табл. 2.

Отношение $БПК_5$/ХПК составляет 62 %, что показывает допустимость применения биологической очистки, но соотношение C : N : P = 5 : 1, 6 : 1 не является оптимальным, что будет сказываться на эффективности. Соотношение гБПК/гN составляет 3,2, что является низким значением при минимальном возможном соотношении для теоретического проведения денитрификации в 3–4 и оптимальных значениях 8–11. Для биологического удаления фосфора теоретическое отношение гБПК/гP должно быть равно не менее 20 : 1, в данном случае показатель равен 5,11, что говорит о низком потенциале в очистке от фосфора биологическим методом. Более того, pH, равный 5,6, ниже стандартных значений хозяйственно-бытовых сточных вод и не является оптимальным для процессов нитрификации и денитрификации.

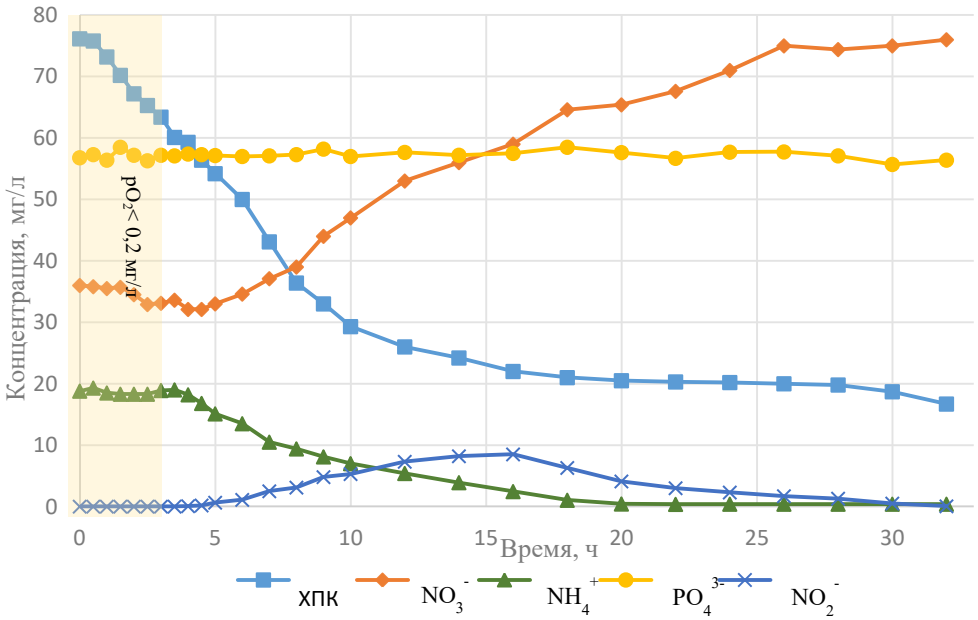


Рис. 2. Очистка сточных вод процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов

Таблица 2

Усредненный состав сточной воды процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов

Показатель	**ХПК**	**БПК$_5$**	**NH_4^+**	**PO_4^{3-}**	**pH**
Концентрация, мг/л	152,3	94,6	37,6	56,79	5,6

Очистка сточных вод процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов

При очистке сточных вод отмечены уменьшения удельных скоростей нитрификации по 1-й и 2-й фазе, что вероятнее связано с неоптимальным значением pH = 5,6. Процессы денитрификации протекали незначительно, и с увеличением времени аноксидной зоны очистка от нитрата ионов кардинально не поменялась. Это стоит связывать с принципиально другим качественным составом органических соединений и неоптимальным значениям pH, что также сказалось и на общей скорости удаления ХПК. Результаты очистки сточных вод процесса культивирования метанокисляющих микроорганизмов представлены на рис. 2.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-101

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК ЛИЧИНОК *HERMETIA ILLUCENS* И ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА К ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ БИОМАССЫ ГРИБОВ РОДА *CORDYCEPS*

STUDY OF THE EFFECT OF ADDING *HERMETIA ILLUCENS LARVAE* AND SUNFLOWER OIL TO THE NUTRIENT MEDIUM ON THE GROWTH OF BIOMASS OF *CORDYCEPS* FUNGI

Г. И. Сараев[1], Р. Д. Марченко[1,2], И. С. Кускова[1]

[1] *Томский государственный университет*
[2] *ООО «Артлайф», Томск*

G. I. Saraev[1], R. D. Marchenko[1,2], I. S. Kuskova[1]

[1] *Tomsk State University*
[2] *Artlife, LLC, Tomsk*

✉ sgi-agrobiotek@mail.tsu.ru

Аннотация

Глубинное культивирование является одним из методов получения биомассы грибов рода *Cordyceps* для нужд промышленности биологически активных веществ. Определяющую роль при этом имеет подбор оптимальных условий культивирования. В настоящей работе рассмотрено влияние добавок в питательную среду для культивирования *Ophiocordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* подсолнечного масла и личинок мухи *Hermetia illucens* на рост биомассы грибов.

Abstract

Submerged cultivation is one of the methods for obtaining biomass of *Cordyceps* fungi for the needs of the biologically active substances industry. The choice of optimal cultivation conditions plays a decisive role in this case. This paper examines the effect of adding sunflower oil and *Hermetia illucens* fly larvae to the nutrient medium for cultivating *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* on the growth of fungal biomass.

Введение

Метаболиты грибов *Ophiocordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* (OS и CM) представляют интерес для производства биологически активных добавок, способствующих лечению различных опухолей, обладающих антиоксидантным эффектом и положительно влияющих на иммунную систему и репродуктивную функцию человека [1, 2].

Добавление в питательную среду CM растительных масел и насекомых приводило к увеличению содержания кордицепина — пуринового алкалоида, обладающего высоким иммуностимулирующим и противораковым потенциалом [3, 4].

Распоряжением правительства Российской федерации от 10.10.2023 № 2761-р продукция, полученная из *Hermetia illucens* (HI), разрешена для использования в качестве корма сельскохозяйственных животных [5]. Можно ожидать использования продукции из HI в пищевой промышленности.

Цель работы — изучение влияния добавок в питательные среды OS и CM подсолнечного масла и личинок HI на рост биомассы грибов.

Объекты и методы

Исследовались культуры OS и смешанные культуры CM и OS из коллекции ООО «Артлайф» (Томск).

Жидкие культуры грибов выращивали 14 суток в колбах с доступом кислорода в диапазоне температур 17–25 °C на используемых в ООО «Артлайф» питательных средах. Подсолнечное масло и молотые личинки HI добавлялись в концентрации 8 и 40 г/л. Контролем служила питательная среда без добавок. Питательные среды стерилизовали в автоклаве.

Ежедневно осуществлялся отбор проб: измерялись pH, титруемая кислотность, проводилась микроскопия отсутствия контаминаций. По окончании эксперимента мицелий отделяли от культуральной жидкости центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 мин.

© Г. И. Сараев, Р. Д. Марченко, И. С. Кускова, 2024

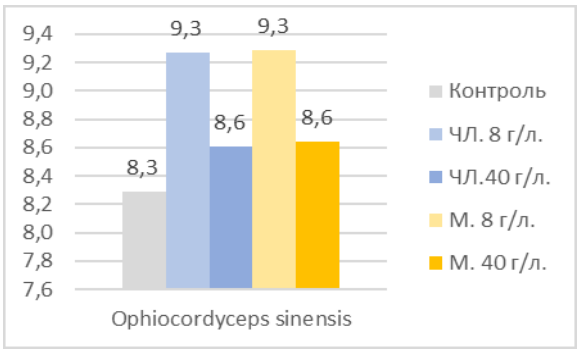


Рис. 1. Содержание мицелия OS в жидкой культуре

Результаты

В культуре OS наибольшее содержание мицелия по массе зафиксировано в пробах с добавками подсолнечного масла и личинок HI в концентрациях 8 г/л и составило 9,3 % в обоих случаях (среднее значение для двух повторений) при контроле 8,3 %. Прирост мицелия при добавках в концентрациях 40 г/л в обоих случаях составил 8,6 % (рис. 1).

Меньший прирост мицелия при большей концентрации добавок, вероятно, связан с препятствующей доступу кислорода плотной поверхностной пленкой и агрессивным для жизненного цикла гриба pH для образцов с подсолнечным маслом и личинками HI соответственно (рис. 2).

Снижение значения титруемой кислотности может указывать на прекращение активной фазы роста гриба к 14-му дню эксперимента (рис. 3).

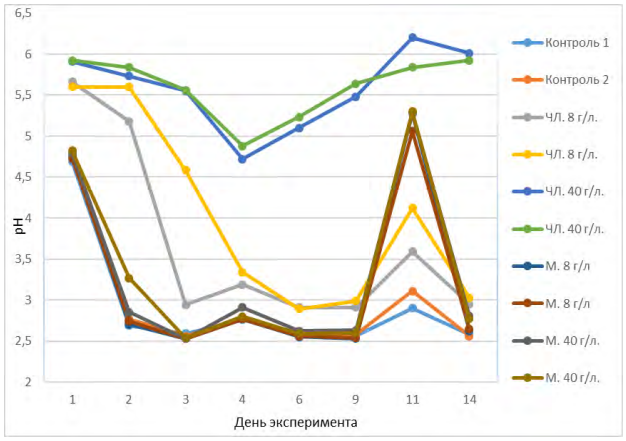


Рис. 2. График изменения pH OS

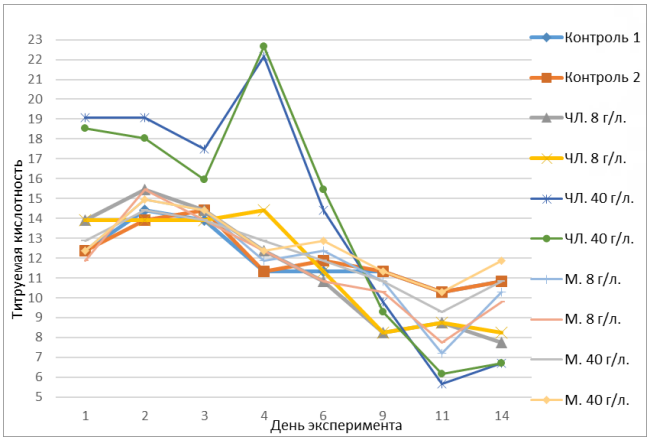


Рис. 3. График изменения титруемой кислотности OS

В смешанной культуре CM и OS зафиксирован меньший прирост мицелия по сравнению с контрольным во всех пробах, кроме образцов с добавлением личинок HI в концентрации 40 г/л (рис. 4).

Во всех пробах зафиксированы более высокие показатели pH для образцов с добавлением личинок HI в концентрации 40 г/л (рис. 2, 5). Для лучшей интерпретации полученных результатов необходимо провести исследования с культурой CM, отделенной от культуры OS, изучить взаимное влияния метаболитов OS и CM.

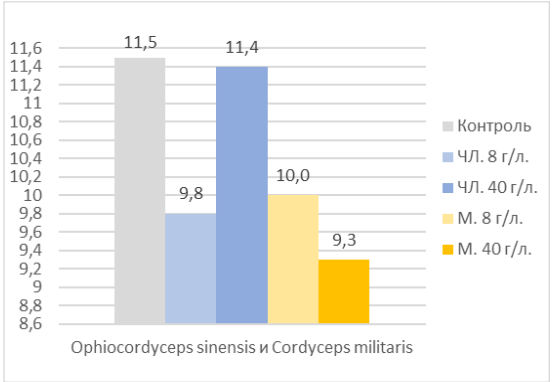


Рис. 4. Содержание мицелия OS и CM в жидкой культуре

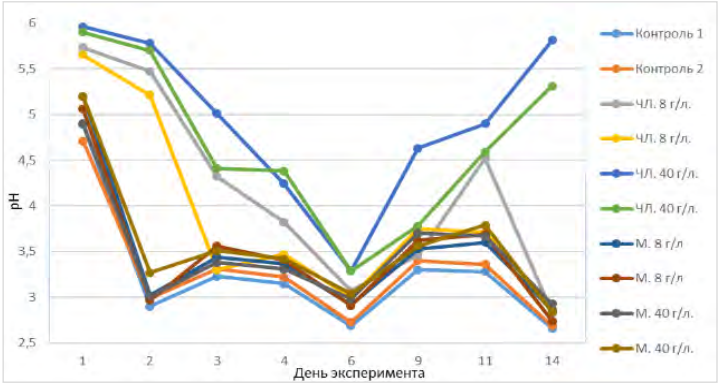


Рис. 5. График изменения pH OS и CM

Снижение значения титруемой кислотности может указывать на прекращение активной фазы роста гриба к 14-му дню эксперимента (рис. 6).

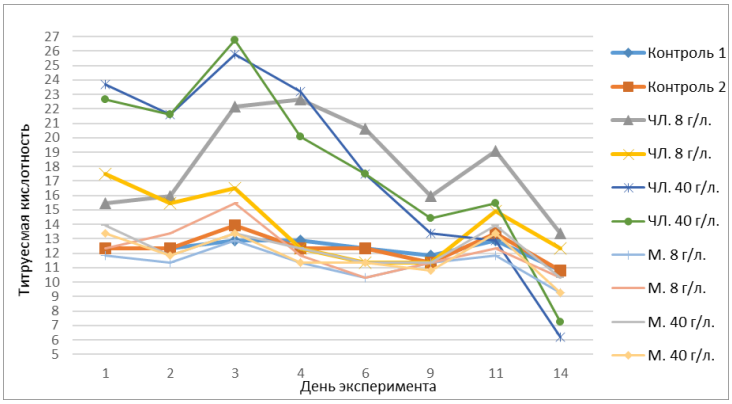


Рис. 6. График изменения титруемой кислотности OS и CM

Заключение

Изучено влияние добавок в питательную среду OS и CM подсолнечного масла и личинок HI на рост биомассы грибов. Установлено, что при добавлении в питательную среду OS подсолнечного масла и личинок HI в концентрациях 8 г/л прирост мицелия существенно выше, чем у контрольных проб.

Имеются другие исследования, согласно которым продукция кордицепина не зависит от накопленной биомассы мицелия [6]. Ведется работа по изучению влияния добавок на продукцию кордицепина.

Литература

1. Автономова А. В., Краснопольская Л. М., Шуктуева М. И. и др. Оценка противоопухолевого действия погруженной культуры *Ophiocordyceps sinensis* и *Cordyceps militaris* // Антибиотики и химиотерапия. 2015. Т. 60. С. 7–8.

2. Chen Y.-C. et al. Functional study of Cordyceps sinensis and cordycepin in male reproduction: A review // J. Food Drug Anal. 2017. Vol. 25, No. 1. P. 197–205.

3. Tang J., Qian Z., Wu, H. Enhancing cordycepin production in liquid static cultivation of Cordyceps militaris by adding vegetable oils as the secondary carbon source // Bioresour. Technol. 2018. Vol. 268. P. 60–67.

4. Turk A., Abdelhamid M. A. A. et al. Cordyceps mushroom with increased cordycepin content by the cultivation on edible insects // Front. Microbiol. 2022. Vol. 13.

5. Распоряжение правительства Российской федерации от 10.10.2023 № 2761-р. URL: http://publication.pravo.gov.ru

6. Крюков В. Ю., Кухаренко А. Е. и др. Продукция кордицепина и аденозина в мицелии и культуральной жидкости. изолятов Cordyceps militaris // Микология и фитопатология. 2012. Т. 46, № 6.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-102

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА: ВОЗМОЖНОСТИ НА ГОСПИТАЛЬНОМ ЭТАПЕ

LABORATORY DIAGNOSIS OF GILBERT'S SYNDROME: POSSIBILITIES AT THE HOSPITAL STAGE

П. А. Селиванов, П. А. Федотов, Д. А. Ульянкин, С. А. Шилин

3-й Военный госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации, Санкт-Петербург

P. A. Selivanov, P. A. Fedotov, 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 эффективности некоторых функциональных нагрузочных проб при диагностике синдрома Жильбера. Уточнены значения динамики фракций билирубина при нагрузочной пробе с никотиновой кислотой и связь с результатами генетического исследования.

Abstract

The analysis of the effectiveness of some functional stress tests in the diagnosis of Gilbert's syndrome was carried out. The values of the dynamics of bilirubin fractions in a stress test with nicotinic acid and the relationship with the results of a genetic study are clarified.

Введение

Синдром Жильбера (СЖ) является наиболее распространенным вариантом в классификации доброкачественных гипербилирубинемий. В зависимости от вида носительства (гомозиготное, гетерозиготное) распространенность СЖ в популяции составляет 5–10 и до 40–45 % соответственно, что делает данную патологию достаточно нередкой. Среди больных СЖ практически в 10 раз чаще встречаются мужчины в возрасте 14–30 лет. В этом возрасте наиболее часто также встречается и манифестация заболевания. Золотым стандартом диагностики СЖ является прямой ДНК-анализ с определением числа (ТА)-повторов в гене UGT1A1 — уридинфосфатглюкуронилтрансферазы, функцией которой является связывание глюкуроновой кислоты с непрямым билирубином. Тем не менее в клинической практике описывается ряд функциональных тестов, направленных на дифференцирование СЖ от других заболеваний, в симптомокомплексе которых также присутствует поражение гепатоцитов.

Цель исследования — провести анализ эффективности клинико-лабораторных возможностей диагностики СЖ при стандартной оснащенности лабораторных отделений без наличия отделов генетических исследований.

Материалы и методы

В исследование были включены 3 человека, которые обследовались и лечились в 3-м Военном госпитали войск национальной гвардии Российской Федерации. Все обследованные были мужчинами в возрасте от 18 до 27 лет. Критериями включения в исследование были наличие следующих симптомов: желтухи, которая могла быть разной степени выраженности; повышенной утомляемости; слабости; нарушения сна; тяжести в правом подреберье; тошноты; изжоги. При дифференциальной диагностике желтух всем пациентам было выполнено скрининговое исследование гемоконтактных инфекций, в частности вирусных гепатитов В (HBsAg) и С (HCV), с помощью стандартных наборов реагентов (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции фирмы изготовителя. Для определения степени выраженности желтухи исследовали уровень сывороточного билирубина колориметрическим фотометрическим методом.

Среди функциональных проб была проведена проба с никотиновой кислотой (НК), представляющей из себя внутривенное введение 5 мл 1%-го раствора НК (50 мг).

В качестве биологического материала для исследования использовали сыворотку периферической крови, забранной из кубитальной вены натощак в утренние часы в вакутейнеры с активатором свертывания. Методом центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин отделяли сыворотку от клеточных элементов.

© П. А. Селиванов, П. А. Федотов, Д. А. Ульянкин, С. А. Шилин, 2024

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 2016. Данные представлены в виде средних значений (M) с расчетом ошибки среднего (m).

Сравнение выборок с определением достоверности различий проводили с использованием критерия Манна — Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Всем обследованным были проведены биохимические исследования с определением уровней общего билирубина, а после и его фракций (непрямого и прямого билирубина). Уровень общего билирубина в сыворотке крови пациентов составлял 58,5 ± 5,1 мкмоль/л. Результаты скрининговых исследований на гемоконтактные инфекции HBsAg, HCV — отрицательные. Дополнительно были исследованы уровни прямого 21,5 ± 1,4 мкмоль/л и непрямого билирубина 36,9 ± 4,2 мкмоль/л натощак.

Для дифференциальной диагностики билирубинемий были проведены пробы с НК с подозрением на СЖ. После введения НК через 3 ч повторно исследовались фракции билирубина. Уровень общего билирубина после введения НК — 80,1 ± 7,2 мкмоль/л, прямого билирубина — 33,7 ± 5,9 мкмоль/л, непрямого билирубина — 46,2 ± 4,4 мкмоль/л. Прирост общего билирубина и фракций после провокации НК составил 36,7; 56,7 и 25,3 % для общего, прямого и непрямого билирубина соответственно. Отмечается статистически значимый прирост всех фракций билирубина после введения НК ($p = 0,003$). Данный феномен происходит вследствие повышения осмотической нестабильности некоторых циркулирующих в кровяном русле эритроцитов, ввиду чего происходит релизинг непрямого билирубина. Получив объективные предпосылки к диагностике СЖ, пациенты были направлены на генетическое исследование, где впоследствии были получены результаты о наличии клинически значимого генотипа, характеризующегося увеличением числа ТА-повторов в гене UGT1A1.

Заключение

Диагностика СЖ на госпитальном этапе должна включать в себя определение фракций билирубина, а также обязательное проведение функциональной нагрузочной пробы с НК с целью повышения эффективности диагностического поиска и дифференциальной диагностики в условиях лабораторий без отдела генетических исследований.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-103

ГИДРОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ МАССОПЕРЕНОСА В ПУЗЫРЬКОВЫХ СРЕДАХ *

HYDRODYNAMIC MODEL FOR MASS TRANSFER PREDICTION IN BUBBLY MEDIA

И. О. Стародумов[1], П. В. Микушин[1,2], К. Е. Махаева[1], М. А. Никишина[1], И. Г. Низовцева[1]

[1] *Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург*
[2] *Московский физико-технический институт*

I. O. Starodumov[1], P. V. Mikushin[1,2], K. E. Makhaeva[1], M. A. Nikishina[1], I. G. Nizovtseva[1]

[1] *Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Ekaterinburg*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology*

✉ ilya.starodumov@urfu.ru

Аннотация

Представлена модель массопереноса в пузырьковом потоке, связывающая поток вещества из пузыря с его геометрическими и динамическими характеристиками. Модель основана на работах В. Г. Левича и справедлива в приближении установившейся однородной пузырьковой среды. Результаты позволяют прогнозировать массообменные характеристики химических или биологических реакторов, комбинируя представленную модель с фотографиями и видеозаписями пузырькового течения.

Abstract

A model of mass transfer in a bubble flow is presented that relates the flow of matter from a bubble to its geometric and dynamic characteristics. The model is based on the works of V. G. Levich and is valid in the approximation of a steady-state homogeneous bubble medium. The results allow us to predict the mass transfer characteristics of chemical or biological reactors by combining the presented model with photo/video records of bubble flow.

Рассмотрим процесс растворения труднорастворимых газов в жидкости (воде) на примере системы из одного пузыря с воздухом (кислородом). Интенсивность этого процесса ограничена скоростью отвода растворенного газа от поверхности пузыря со стороны жидкой фазы.

Одним из наиболее общих уравнений, описывающих массоперенос в такой системе выступает уравнение конвективной диффузии:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla \cdot \left(D \nabla C - \mathrm{v} C \right) + \mathcal{R} ,$$

где $C = C(\mathbf{r},t)$ — концентрация растворенного кислорода, t — время, D — коэффициент диффузии, $\mathbf{v}$ — поле скорости жидкости, $\mathcal{R}$ — функция источника или стока вещества (применяется для учета химических и биологических реакций с участием растворенного газа).

В упрощенной постановке задачи коэффициент диффузии можно считать постоянным, источники и поглотители отсутствуют, а поле скоростей описывает несжимаемый поток с нулевым значением дивергенции. Предположим, что концентрация растворяющегося газа на поверхности пузырька остается постоянной, а газ растворяется стационарно за счет конвективного переноса растворенных молекул. Также будем считать, что пузырь сферический, а поле скоростей набегающей жидкости симметрично по углу ϕ. Так как движение пузыря симметрично относительно вертикальной оси, скорость движения жидкости не зависит от угла ϕ и равна нулю ($v_\phi = 0$). Поэтому при переходе к сферическим координатам с началом в центре пузыря (угол θ отсчитывается от точки набегания потока против часовой стрелки) можно опустить лишние слагаемые. Таким образом, с учетом вышесказанного уравнение конвективной диффузии примет вид:

$$v_r \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r} \frac{\partial C}{\partial \theta} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right).$$

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 24-11-00351).

© И. О. Стародумов, П. В. Микушин, К. Е. Махаева, М. А. Никишина, И. Г. Низовцева, 2024

При больших значениях числа Пекле можно не учитывать член $\frac{2}{r}\frac{\partial C}{\partial r}$. Это происходит благодаря тому, что $Pe = Re \cdot Sc = \frac{UR}{D}$. Таким образом получаем уравнение пограничноголоя:

$$v_r \frac{\partial C}{\partial r} + \frac{v_\theta}{r}\frac{\partial C}{\partial \theta} = D\frac{\partial^2 C}{\partial r^2}$$

с граничными условиями:

$$C = C^* = \text{const при } r = R,$$
$$C \to C_\infty = \text{const при } r \to \infty.$$

Для решения воспользуемся подходом, предложенным В. Г. Левичем [1], вводя в рассмотрение функцию тока ψ такую, что:

$$v_\theta = -\frac{1}{r\sin\theta}\frac{\partial \psi}{\partial r},$$
$$v_r = \frac{1}{r^2\sin\theta}\frac{\partial \psi}{\partial \theta}.$$

При этом граничные условия для функции тока будут иметь вид:

$$C = C^* = \text{const при } \psi \to 0,$$
$$C \to C_\infty = \text{const при } \psi \to \infty.$$

Тогда можно рассматривать концентрацию как функцию $C\left(\theta, \psi\left(\theta, r\right)\right)$. Выполнив данную подстановку, можно получить выражение для плотности диффузионного потока:

$$j = -D\left(\frac{\partial C}{\partial y}\right)_{y=0} = -\frac{DRv_0\sin^2\theta\left(C_\infty - C^*\right)}{\sqrt{Dv_0R^3\left(\frac{2}{3} - \cos\theta + \frac{\cos^3\theta}{3}\right)}} = \frac{D\left(C^* - C_\infty\right)}{\delta},$$

где δ — толщина диффузионного слоя пузыря, равная

$$\delta = \sqrt{\frac{\pi}{3}}\left(\frac{DR}{v_0}\right)^{1/2}\sqrt{\frac{2+\cos\theta}{(1+\cos\theta)^2}}.$$

Таким образом можно вычислить полный поток вещества через поверхность пузыря Σ:

$$J \overset{\text{def}}{=} \int_\Sigma \mathbf{j}\cdot d\mathbf{S} = 2\pi R^2 \int_0^\pi j\sin\theta d\theta,$$
$$J = 8\sqrt{\frac{\pi}{3}}\left(\frac{Dv_0}{R}\right)^{1/2} R^2\left(C^* - C_\infty\right).$$

Для умеренных чисел Рейнольдса Левичем была предложена связь между скоростью движения жидкости на поверхности пузыря v_0 и скоростью набегающего потока U (также относительная скорость движения пузыря) [1]:

$$U = \frac{2}{3}v_0.$$

Таким образом, если пренебречь диффузионным потоком в области отрыва (так как площадь поверхности данной области мала), итоговая формула для полного потока вещества представима в виде

$$J = 8\sqrt{\frac{\pi}{2}}\left(\frac{DU}{R}\right)^{1/2} R^2\left(C^* - C_\infty\right).$$

В безразмерном виде поток растворенного газа можно записать как число Шервуда, выраженное через числа Рейнольдса и Шмидта:

$$\langle \beta \rangle \overset{\text{def}}{=} \frac{\langle j \rangle}{C^* - C_\infty} = \frac{J / S_\Sigma}{C^* - C_\infty},$$

$$Sh \overset{\text{def}}{=} \frac{\langle \beta \rangle L}{D} = \frac{JR}{S_\Sigma D\left(C^* - C_\infty\right)} = \sqrt{\frac{2}{\pi}} Re^{1/2} Sc^{1/2}.$$

Здесь $\langle \beta \rangle$ — средний по поверхности коэффициент массоотдачи (усреднение локального коэффициента массоотдачи как полный поток вещества, деленный на полную площадь поверхности межфазной границы), S_Σ — площадь поверхности пузыря.

Полученная модель, связывающая поток газа из пузыря в жидкость с размерами и скоростью пузыря, может использоваться для анализа пузырьковых сред по данным фотографий и видеосъемки с применением алгоритмов компьютерного зрения. Так, при помощи нейросетевой модели сегментации могут быть найдены параметры, определяющие интенсивность массообмена в пузырьковой среде: размеры газовых включений и их скорости. Например, в работе [2] показана возможность эффективной сегментации пузырей в газонасыщенной среде как классическими методами компьютерного зрения, так и нейросетевыми алгоритмами. Эти методы могут быть расширены за счет представленной модели и использоваться для уточнения локальных массообменных характеристик в пузырьковых средах химических и биологических реакторов [3].

Литература

1. Левич В. Г. Физико-химическая гидродинамика. М.; Ижевск: Ин-т компьют. исслед., 2016. С. 699.

2. Nizovtseva I. et al. Assessing the mass transfer coefficient in jet bioreactors with classical computer vision methods and neural networks algorithms // Algorithms. 2023. Vol. 16. P. 125.

3. Кафаров В. В., Винаров А. Ю., Гордеев Л. С. Моделирование биохимических реакторов. М.: Лесная промышленность, 1979. С. 344.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-104

ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К В-КЛЕТОЧНЫМ ДЕТЕРМИНАНТАМ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

SIGNIFICANCE OF ANTIBODY DETECTION TO B-CELL DETERMINANTS OF ENVELOPE PROTEINS OF HEPATITIS C VIRUS

М. Д. Стучинская[1,2], Л. И. Николаева[2], Н. С. Шастина[1]

[1] *Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва*
[2] *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва*

M. D. Stuchinskaya[1,2], L. I. Nikolaeva[2], N. S. Shastina[1]

[1] *Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow*
[2] *Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow*

✉ mayastaya@mail.ru

Аннотация

Цель исследования — выявить антитела к пептидам, воспроизводящим консервативные В-клеточные эпитопы оболочечных белков Е1 и Е2 ВГС, и оценить их возможную значимость для прогноза элиминации вируса. Синтез пептидов осуществляли твердофазным методом. По результатам иммуноферментного анализа установлено, что наличие антител к одному из анализируемых пептидов связано с достижением устойчивого вирусологического ответа.

Abstract

The aim of the study was to analyze infected human antibody response to peptides reproducing B-cell epitopes of HCV envelope proteins to assess their possible association with virus elimination. The synthesis of peptides was carried out by the solid phase method. According to the results of enzyme-linked immunosorbent assay, it was found that the presence of antibodies to one of the analyzed peptides was associated with achieving a sustained virological response.

Вирусный гепатит С является широко распространенным заболеванием, которым, по оценкам Всемирной организации здравоохранения за 2022 г., страдает около 58 млн человек [1]. При этом ежегодно регистрируется примерно 1,5 млн новых случаев заражения. После первичной инфекции примерно у 70–85 % развивается хронический гепатит С, который может привести к циррозу печени и гепатоцеллюлярной карциноме. Спонтанное или самопроизвольное разрешение инфекции связано с выработкой ранних и интенсивных клеточных и гуморальных иммунных ответов. В 2023 г. показатель заболеваемости хроническим гепатитом С в России составил 31,63 на 100 тыс. населения [2]. Несмотря на внедрение высокоэффективных противовирусных препаратов прямого действия (ППД), противовирусное лечение не оказало серьезного влияния на ограничение инфекции. Устойчивый вирусологический ответ (УВО) достигается в 90 % случаев. Однако из-за высокой доли упущенных диагнозов и высоких затрат на препараты лечением охвачено около 10 % инфицированных людей. Более того, лица, прошедшие успешное лечение, не защищены от повторного заражения.

Оболочечные гликопротеины Е1 и Е2 ВГС взаимодействуют с рецепторами, участвуют в процессе проникновения вируса в клетки хозяина и являются основными мишенями вируснейтрализующих антител. Нейтрализующие антитела являются важными компонентами иммунного ответа хозяина. Считается, что они препятствуют процессу проникновения вируса.

Ранее было продемонстрировано, что наличие антител к комплексу Е1Е2 до начала лечения ассоциировано с достижением УВО на терапию ППД, т. е. может являться предиктивным маркером [3]. Однако до сих пор не выяснена роль отдельных В-эпитопов оболочечных белков ВГС.

Цель исследования — выявить антитела к пептидам, воспроизводящим консервативные В-клеточные эпитопы оболочечных белков Е1 и Е2 ВГС, и оценить их возможную значимость для прогноза элиминации вируса.

На основании анализа литературных данных по детерминантам оболочечных белков ВГС были выбраны и синтезированы 6 значимых пептидов, представляющих собой иммуногенные В-клеточные эпитопы.

© М. Д. Стучинская, Л. И. Николаева, Н. С. Шастина, 2024

Пептиды были получены с использованием твердофазного синтеза на смоле Ванга по Fmoc-протоколу в ручном режиме методом активированных эфиров. Очистку пептидов осуществляли обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (офВЭЖХ), структуру синтезированных пептидов подтверждали масс-спектрометрией MALDI-TOF. Чистота полученных препаратов пептидов, по данным аналитической офВЭЖХ, составила более 95 %. Выходы пептидов составили от 18 до 25 %.

Для подтверждения инфицирования ВГС выявляли геном вируса методом ОТ-ПЦР («РеалБест РНК ВГС», качественный или количественный вариант, Вектор-Бест, РФ) и специфические антитела методом ИФА («РекомбиБест анти-ВГС IgM» и «Бест анти-ВГС — спектр», Вектор-Бест, РФ).

При наличии нормального распределения для оценки достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента, при ином распределении применяли точный метод Фишера. Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при $p < 0,05$.

Были исследованы образцы сывороток крови пациентов, имеющих хронический гепатит С и получивших лечение ПППД (N = 53). 29 участников достигли УВО, остальные 24 участника завершили терапию неудачно. Изучение иммунореактивности на сыворотках крови людей, инфицированных ВГС, проводилось стандартным методом твердофазного иммуноферментного анализа. У 94,3 % участников были обнаружены антитела к анализируемым пептидам. Данные по частоте выявления антител указаны в таблице.

Для пептида (**V**) были получены результаты, отвечающие критериям статистической значимости ($p = 0,002$): участники, имеющие антитела к данному пептиду до начала терапии, чаще достигали УВО, чем участники, у которых не были обнаружены антитела. Данный пептид воспроизводил консервативный иммунодоминантный В-эпитоп из Е2, антитела к которому обладают способностью нейтрализовать ВГС разных генотипов.

Анализ взаимосвязи между достижением УВО и частотой выявления антител к пептидам

Пептид	Частота выявления антител (n), %		p-value
	Участники с УВО, N = 29	Участники без УВО, N = 24	
I	48,3 ± 9,6 (14)	37,5 ± 9,9 (9)	0,579
II	44,8 ± 9,6 (13)	33,3 ± 9,6 (8)	0,416
III	37,9 ± 9,3 (11)	16,7 ± 7,6 (4)	0,127
IV	62,1 ± 9,3 (18)	41,7 ± 10,1 (10)	0,173
V	69,0 ± 8,9 (20)	25,0 ± 8,1 (6)	0,002
VI	82,8 ± 7,3 (24)	62,5 ± 9,9 (15)	0,124

Таким образом, можно предположить, что наличие или отсутствие антител к пептиду (**V**) может являться одним из прогностических маркеров для оценки исхода терапии ПППД.

Литература

1. Hepatitis C: Key Facts // WHO. 2022.

2. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 г.: гос. докл. М., 2024.

3. Virlogeux V., Berthillon P., Bordes I. et al. Anti-E1E2 antibodies status prior therapy favors direct-acting antiviral treatment efficacy // Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol. 2018. Vol. 42 (4). P. 313–318.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-105

ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ УСИЛИВАЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ СЕНСОМОТОРНОГО ДЕФИЦИТА КРЫС ПОСЛЕ ТРАВМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА [*]

GLIAL PROGENITOR CELL TRANSPLANTATION ENHANCES RECOVERY OF SENSORIMOTOR DEFICITS IN RATS AFTER TRAUMATIC BRAIN INJURY

А. К. Судьина[1,2], Д. В. Гольдштейн[1,2], Д. Н. Силачев[3], Д. И. Салихова[1,2]

[1]Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины медицинского института РУДН, Москва
[2]Медико-генетический научный центр им. акад. Н.П. Бочкова, Москва
[3]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

A. K. Sudina[1,2], D. V. Goldshtein[1,2], D. N. Silachev[3], D. I. Salikhova[1,2]

[1]Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN Medical Institute, Moscow
[2]Research Centre for Medical Genetics, Moscow
[3]Lomonosov Moscow State University

✉ sudyina_ak@rudn.ru

Аннотация

Поиск новых методов терапии черепно-мозговой травмы — одна из важных задач современной биомедицины. В данной работе был исследован терапевтический эффект глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, на экспериментальной модели черепно-мозговой травмы.

Abstract

The search for new methods of therapy of traumatic brain injury is one of the important tasks of modern biomedicine. In this work, the therapeutic effect of glial progenitor cells obtained from induced pluripotent stem cells was investigated in an experimental model of traumatic brain injury.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) характеризуется множеством патологических процессов, включающих в себя некроз тканей, отек мозга, оксидативный стресс, воспалительные и иммунные реакции, а также нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера [1–3]. В силу сложности патомеханизма заболевания поиск новых и эффективных подходов терапии ЧМТ остается актуальной задачей. Одним из многообещающих подходов, направленных на восстановление поврежденных тканей после ЧМТ, является клеточная терапия.

Глиальные клетки обеспечивают механическую поддержку нейронов, а также выполняют репаративные, метаболические и барьерные функции в тканях головного мозга. Благодаря прогрессу в технологии создания индуцированных плюрипотентных стволовых клеток стало возможным получать разнообразные типы клеток, которые происходят из трех зародышевых листков, на различных этапах дифференцировки. В том числе можно получить глиальные клетки-предшественники (ГКП), которые в дальнейшем могут быть использованы для клеточной терапии [4].

ГКП трансплантировали крысам путем внутриартериального введения в экспериментальной модели черепно-мозговой травмы. Для анализа терапевтической эффективности проводили тест «Постановка конечности на опору» на 1, 3, 7 и 14-е сутки и МРТ-исследование на 14-е сутки. По сравнению с контрольной группой наблюдалось существенное уменьшение сенсомоторного дефицита на 3, 7 и 14-е сутки после травмы (табл. 1), а также снижение объема очага (табл. 2).

Для исследования миграции крысам вводили ГКП, меченные липофильным красителем PKH26, затем проводили гистологическое исследование на 1, 3 и 7-е сутки после введения. В тканях головного мозга клетки обнаруживались на 1-е сутки после введения. На 3-и и 7-е сутки после введения ГКП не были выявлены.

[*] Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № КБК 075 0110 47 1 S7 24600 621) по теме «Разработка новых лекарственных средств для терапии неврологических заболеваний».

© А. К. Судьина, Д. В. Гольдштейн, Д. Н. Силачев, Д. И. Салихова, 2024

Таблица 1

Влияние ГКП на неврологический статус животных

Параметр	0 (до ЧМТ)	1 (после ЧМТ)	3 (после ЧМТ)	7 (после ЧМТ)	14 (после ЧМТ)
Контрольная	13,4 ± 0,72	1,5 ± 0,55	2,3 ± 1,03	5,7 ± 3,27	6,0 ± 2,83
С введением ГКП	13,0 ± 1,15	2,3 ± 0,58	6,8 ± 2,68*	10,3 ± 2,29*	10,0 ± 2,83*

Примечание. Результаты теста «Постановка конечности на опору». Данные проанализированы с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Хольма — Сидака на множественное сравнение и представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (* — $p \leqslant 0{,}05$).

Таблица 2

Влияние ГКП на объем травмы

Параметр	Объем травмы, 14-е сутки
Контрольная группа	54,9 ± 15,8
Группа с введением ГКП	36,6 ± 7,6*

Примечание. Результаты анализа МРТ-исследования. Данные проанализированы с использованием t-теста и представлены в виде среднего ± стандартное отклонение (* — $p \leqslant 0{,}05$).

Введение ГКП путем внутриартериальной инъекции в каротидные артерии приводило к эффективной миграции клеток в ткани головного мозга. Клеточная терапия способствовала нейровосстановлению и уменьшению объема поврежденной области у животных с ЧМТ. Результаты исследования показывают, что клеточная терапия с применением глиальных клеток-предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, может стать перспективным методом лечения черепно-мозговых травм.

Литература

1. Wolf J.A., Stys P.K., Lusardi T. et al. Traumatic Axonal Injury Induces Calcium Influx Modulated by Tetrodotoxin-Sensitive Sodium Channels // J. Neurosci. 2001. Vol. 21 (6). P. 1923–1930.

2. Barkhoudarian G., Hovda D.A., Giza C.C. The Molecular Pathophysiology of Conclusive Brain Injury // Phys. Med. Rehabilitation North America. 2016. Vol. 27 (2). P. 373–393.

3. Jackson M.L., Srivastava A.K., Cox C.S. Preclinical progenitor cell therapy in traumatic brain injury: a meta-analysis // J. Surgical Res. 2017. Vol. 214. P. 38–48.

4. Goldman S.A., Nedergaard M., Windrem M.S. Glial progenitor cell-based treatment and modeling of neurological disease // Sci. 2012. Vol. 22 (3). P. 619–623.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-106

КОМПОЗИТНЫЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

COMPOSITE HYDROGEL MATRICES FOR IMMOBILIZATION OF MICROORGANISMS

Д. А. Тарасова, И. А. Черенков

Удмуртский государственный университет, Ижевск

D. A. Tarasova, I. A. Cherenkov

Udmurt State University, Izhevsk

✉ dashatarasova20@mail.ru

Аннотация

Одним из классических методов биотехнологии является иммобилизация клеток в гидрогели, которые имитируют естественные условия для микроорганизмов. Цель работы — разработка технологии получения многокомпонентных гидрогелевых носителей на основе биосовместимых полимеров (ПВС и лигнина) для иммобилизации микроорганизмов, утилизирующих органические отходы.

Abstract

One of the classic methods of biotechnology is the immobilization of cells into hydrogels that mimic the natural conditions for microorganisms. The aim of the work is to develop a technology for the production of multicomponent hydrogel carriers based on biocompatible polymers (PVA and lignin) for the immobilization of microorganisms that recycle organic waste.

Одним из классических биотехнологических методов, который предполагает включение живых клеток в изолированную фазу, отделенную от фазы свободного раствора, но способную обмениваться с ним питательными веществами и продуктами обмена, является иммобилизация клеток [1, 2]. Включение клеток в гидрогели является наиболее безопасным методом их иммобилизации, поскольку гелевая среда в определенной мере имитирует матрикс биопленок, что приближает состояние микробных клеток к естественным условиям [3]. Использование таких биосовместимых гидрогелевых конструктов для иммобилизации микроорганизмов с целью очистки сточных вод от органических отходов — перспективное направление экологических биотехнологий.

Основной идеей работы является улучшение качества гидрогелевых носителей на основе поливинилового спирта путем добавления в их состав природных наполнителей, призванных регулировать деградационные, биосовместимые, адсорбционные и гидратационные свойства.

Цель работы — разработка технологии получения многокомпонентных гидрогелевых носителей на основе биосовместимых полимеров (поливиниловый спирт, лигнин) для дальнейшей иммобилизации микроорганизмов, утилизирующих органические и неорганические отходы, а также исследование физических, гидратационных и сорбционных свойств полученных конструктов, в том числе с иммобилизованными клетками.

Гидрогелевые носители получали путем сшивания синтетической полимерной матрицы из ПВС в сочетании с альгинатом натрия (АН). Сшивание проводилось в водном растворе $CaCl_2$ и H_3BO_3 ($C(CaCl_2)$ = 0,5 %, $C(CaCl_2)$ = 1,0 %) в течение суток. Вторичная сшивка проводилась в 0,9 М растворе Na_2SO_4 в течение 48 ч. В работе было исследовано несколько многокомпонентных систем на основе ПВС и АН, представленных в таблице, с добавлением желатина, активированного угля и лигнина.

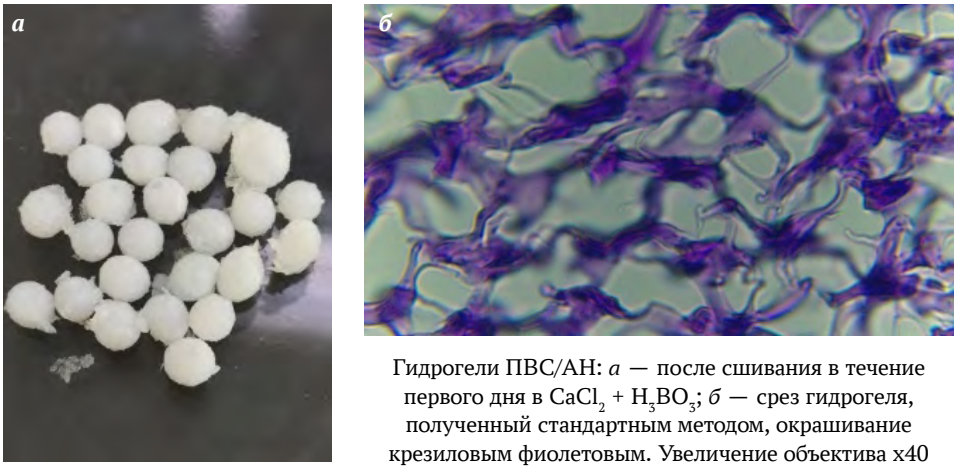
Для выбора оптимальной концентрации Na_2SO_4 была проведена серия экспериментов с использованием 0,9; 0,5 и 0,2 М растворов Na_2SO_4, в результате которых оптимальной концентрацией Na_2SO_4 для проведения опытов является 0,9 М, поскольку конструкты дольше сохраняли свою форму, не слипались и не растворялись.

Была изучена внутренняя структура полученных образцов ПВС/АН. Для этого были получены срезы гидрогелей на криостате (см. рисунок): гидрогель, полученный стандартным методом, обладает пористой равномерной структурой и имеет большую площадь внутренней поверхности.

© Д. А. Тарасова, И. А. Черенков, 2024

Многокомпонентные гидрогелевые носители

Гидрогелевый носитель, обозначение	Дополнительный компонент, %
ПВС/АН	–
ПВС/желатин/АН	0,25
ПВС/акт. уголь/АН	0,5
ПВС/лигнин/АН	1,0
ПВС/лигнин/АН	0,5
ПВС/лигнин/АН	0,25



Гидрогели ПВС/АН: *а* — после сшивания в течение первого дня в $CaCl_2 + H_3BO_3$; *б* — срез гидрогеля, полученный стандартным методом, окрашивание крезиловым фиолетовым. Увеличение объектива х40

Добавление желатина приводит к образованию более плотного гидрогеля с желтоватым оттенком, который со временем превращается в желеобразную массу и становится бесцветным. Аналогичные результаты наблюдаются при использовании активированного угля, когда полимерные конструкции, включающие лигнин, представляют собой трехмерные структуры с поперечными связями. Эти структуры сохраняют свою форму дольше, чем предыдущие варианты, и характеризуются плотной структурой.

Были изучены гидратационные свойства: в первые часы наблюдался быстрый рост массы, что указывает на быструю абсорбцию молекул растворителя гидрогелем. Потеря массы происходила в течение первых суток.

Сорбционные свойства ПВС/АН и ПВС/лигнин/АН были изучены на стандартном растворе метиленового голубого. Результат исследования дает основание предполагать наибольшую адекватность представления сорбционных характеристик гидрогелевых шариков с лигнином с использованием математической модели Фрейндлиха, согласно которой адсорбция происходит на гетерогенном слое сорбента с неопределенным количеством активных центров связывания.

Таким образом, экспериментально обоснована возможность получения гидрогелевых носителей. Такие материалы обладают потенциалом для создания структур разной формы с целью иммобилизации биологических материалов и разработки искусственного внеклеточного матрикса, имитирующего биопленки. Благодаря используемым наполнителям можно контролировать скорость разложения и гидродинамическую стабильность конструкций, что делает их подходящими для применения в системах водоочистки.

Литература

1. Woodward J. Methods of immobilization of microbial cells // J. Microbiol. Methods. 1988. Vol. 8, № 1–2. P. 91–102.
2. Толмачева И. А. Биотехнология: учеб. пособие / Перм. гос. ун-т. Пермь, 2022. 177 с.
3. Lieleg O., Ribbeck K. Biological Hydrogels as Selective Diffusion Barriers // Trends Cell Biol. 2011. Vol. 21. P. 543–551.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-107

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ИБУПРОФЕНА В ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОДАХ ОЗЕРА БАЙКАЛ*

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF IBUPROFEN CONTENT IN ENDEMIC AMPHIPODS LAKE BAIKAL

Т. Ю. Тельнова, М. М. Моргунова, А. А. Власова, С. С. Шашкина, Е. А. Мишарина, В. Н. Шелковникова, О. Е. Липатова, А. Ю. Белышенко, А. С. Листопад, Д. В. Аксёнов-Грибанов

Иркутский государственный университет

T. Yu. Telnova, M. M. Morgunova, A.A Vlasova, S. S. Shashkina, E. A. Misharina, V. N. Shelkovnikova, O. E. Lipatova, A.Yu. Belyshenko, A. S. Listopad, D. V. Axenov-Gribanov

Irkutsk State University

✉ telnovatamara1410@gmail.com

Аннотация

Загрязнение лекарственными препаратами является одной из распространенных и значимых проблем на планете. В ходе данного исследования проведена количественная оценка содержания ибупрофена в образцах амфипод озера Байкал, отобранных в два сезона — весной и осенью 2022 г. Показано, что амфиподы способны накапливать в себе ибупрофен на уровне от 14,92 до 1151,32 нг/г.

Abstract

Drug contamination is one of the most widespread and significant problems on the planet. This study quantified ibuprofen content in samples of Lake Baikal amphipods collected in two seasons, spring and autumn 2022. Amphipods were shown to be able to accumulate ibuprofen in amounts ranging from 14,92 to 1151,32 ng/g.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) представляют собой один из основных терапевтических классов молекул, загрязняющих водные экосистемы. Этот класс широко используется в терапии человека и животных благодаря своим обезболивающим, жаропонижающим и противовоспалительным свойствам [1]. Доступность, быстродействие и распространенность НПВП усиливают спрос во всем мире, тем самым стимулируя их производство.

Особый интерес среди НПВП представляет ибупрофен, который широко используется в медицинской практике. Однако частое применение ибупрофена считается потенциальным экологическим риском, так как годовое производство лекарственного препарата достигает до 300 тыс. т [2]. Также известно, что ибупрофен выводится из организма в нативной форме или в виде метаболитов, попадая в различные водоемы [3].

Согласно опубликованным данным, ибупрофен обнаружен в водных экосистемах разных государств. Предположено, что, подобно другим водоемам, ибупрофен может попадать и в экосистему озера Байкал. Озеро Байкал является крупнейшим природным резервуаром пресной воды и в настоящий момент считается активным рекреационным и туристическим центром.

Цель данного исследования — количественный анализ содержания ибупрофена в эндемичных амфиподах озера Байкал с помощью высокоточных методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии.

В качестве объектов исследования выбраны амфиподы родов *Eulimnogammarus* spp. и *Brandtia* spp. Образцы рода *Eulimnogammarus* spp. отобраны в прибрежной зоне пос. Култук, пос. Листвянка, пос. Большое Голоустное, пос. Бугульдейка и р. Ангара, в черте Иркутска. Образцы отобраны в два сезона — весной и осенью 2022 г. Амфиподы рода *Brandtia* spp. отобраны в р. Ангара и пос. Листвянка весной 2022 г. Исследование выполнено на базе хромато-масс-спектрометрического комплекса Agilent Infinity II с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470B (QQQ).

В ходе качественного анализа показано, что ибупрофен обнаружен в образцах амфипод рода *Eulimnogammarus* spp., отобранных в р. Ангара, пос. Листвянка и пос. Бугульдейка. В то же время в составе ам-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России (№ FZZE 2024-0011).

© Т. Ю. Тельнова, М. М. Моргунова, А. А. Власова, С. С. Шашкина, Е. А. Мишарина, В. Н. Шелковникова, О. Е. Липатова, А. Ю. Белышенко, А. С. Листопад, Д. В. Аксёнов-Грибанов, 2024

фипод, отобранных в пос. Большое Голоустное и пос. Култук, ибупрофен не обнаружен. Ибупрофен был также выявлен в образцах амфипод рода *Brandtia* spp., отобранных в р. Ангара и пос. Листвянка.

В ходе количественного анализа показано, что в образцах амфипод рода *Eulimnogammarus* spp., отобранных в пос. Листвянка, концентрация ибупрофена составляет от 14,92 до 166,38 нг/г. В образцах амфипод рода *Eulimnogammarus* spp., отобранных в р. Ангара, ибупрофен обнаружен в концентрации от 16,84 до 46,50 нг/г, а в амфиподах рода *Brandtia* spp. концентрация составила от 174,9 до 439,69 нг/г. Все амфиподы, перечисленные выше, были отобраны в весенний период. В образцах амфипод рода *Eulimnogammarus* spp., отобранных в осенний период в пос. Листвянка, ибупрофен обнаружен на уровне от 4,19 до 29,65 нг/г, а в пробах, отобранных в пос. Бугульдейка, — от 18,33 до 1151,32 нг/г.

Таким образом, в ходе настоящего исследования показано, что байкальские эндемичные амфиподы и, вероятно, иные беспозвоночные обитатели в своей естественной среде обитания могут сталкиваться с таким загрязнителем, как ибупрофен, относящийся к группе лекарственных препаратов.

Литература

1. Parolini M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: A review // Sci. Total Env. 2020. Vol. 740. P. 140043.

2. Marchlewicz A., Guzik U., Wojcieszyńska D. Over-the-counter monocyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment-sources, risks, biodegradation // Water, Air, Soil Pollut. 2015. Vol. 226. P. 1–13.

3. Vieno N., Sillanpää M. Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment plant — A review // Env. Int. 2014. Vol. 69. P. 28–39.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-108

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕОЛИПИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦАХ *

ANALYSIS OF PROTEOLIPID AND NUCLEIC ACID CONTENTS OF BIOLOGICAL NANOPARTICLES

А. С. Тихонов[1], С. А. Брезгин[1,2], А. С. Фролова[1], Н. И. Пономарева[1,2], А. П. Костюшева[1], Е. Ю. Паришина[3], О. В. Слатинская[3], Г. В. Максимов[3], А. А. Замятнин[3], В. П. Чуланов[4], Д. С. Костюшев[1,2]

[1]*Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных болезней им. Марциновского Сеченовского университета, Москва*
[2]*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*
[3]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[4]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

A. S. Tikhonov[1], S. A. Brezgin[1,2], A. S. Frolova[1], N. I. Ponomareva[1,2], A. P. Kostyusheva[1], E. J. Parshina[3], O. V. Slatinskaya[3], G. V. Maksimov[3], A. A. Zamyatnin[3], V. P. Chulanov[4], D. S. Kostyushev[1,2]

[1]*Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector-Borne Diseases, Sechenov University, Moscow*
[2]*Sirius University of Science and Technology, Sochi*
[3]*Lomonosov Moscow State University*
[4]*Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ andrey.tikhonov97@gmail.com

Аннотация

Биологические наночастицы (БН) — перспективные средства доставки препаратов и важные биомаркеры при ряде заболеваний. Нами показано, что стандартные методы неэффективно высвобождают белки и РНК из БН, приводя к их недооценке, и оптимизирован метод высвобождения из всех видов БН. Сравнение спектров Рамановской спектроскопии и SERS различных БН выявили отличия в составе и жесткости их мембран, которые объясняют отличия в эффективности высвобождения содержимого.

Abstract

Biological nanoparticles (BNs) have the potential to serve as effective drug delivery vehicles and valuable biomarkers for a range of diseases. In this study, we demonstrate for the first time that the current approaches do not efficiently release the proteins and RNA of BNs, resulting in significant underestimation of their contents. Furthermore, a universal protocol for the efficient release of proteins and nucleic acids from all types of BNs has been developed. This study presents, for the first time, a comparison of Raman spectroscopy and SERS spectra for biological nanoparticles, which revealed differences in the protein-lipid composition of BNs and the stiffness of their membranes. The comparative spectra elucidate the underlying reasons for the differences in the release efficiency of proteins and RNA from different BNs.

Внеклеточные везикулы (*Extracellular vesicles*, EV) — секретируемые эукариотическими клетками биологические наночастицы. Ранее была описана доставка миРНК с помощью EV для нокдауна генов. Это открытие положило начало нескольким десятилетиям исследований, направленных на использование EV в качестве системы доставки различных терапевтических средств, включая низкомолекулярные соединения, РНК, белки, а также компоненты вакцин [1–3]. Благодаря высокой биосовместимости, способности преодолевать биологические барьеры и программируемым свойствам EV считаются идеальным средством доставки лекарств. Однако долгое время технические ограничения на крупномасштабное производство препятствовали их практическому применению [4, 5]. EV также широко используются в молекулярной диагностике в качестве раннего онкомаркера, а также для диагностики неврологических заболеваний, аутоиммунных расстройств и других заболеваний [6].

На основе EV были разработаны новые искусственные типы биологических наночастиц. К основным типам БН относятся экзосом-подобные наночастицы (emNV), полученные путем экструзии клеток через серию фильтров с разным диаметром пор [7]; мембранные наночастицы [8]; гибридные наночастицы [9, 10]. Гибридные наночастицы получены путем слияния БН с органическими наночастицами, такими как липосомы [10, 11]. Мето-

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 23-75-10025).

© А. С. Тихонов, С. А. Брезгин, А. С. Фролова, Н. И. Пономарева, А. П. Костюшева, Е. Ю. Паришина, О. В. Слатинская, Г. В. Максимов, А. А. Замятнин, В. П. Чуланов, Д. С. Костюшев, 2024

ды анализа и определения характеристик EV разрабатывались и совершенствовались на протяжении нескольких десятилетий [12], но для других типов БН эти протоколы в основном были приняты без изменений.

Мы показали, что существующие протоколы имеют низкую эффективность при выделении белка и РНК из БН, включая emNV, мембранные и гибридные наночастицы. Для увеличения выделения белка мы использовали различные условия и продемонстрировали, что добавление сапонина заметно улучшает выделение белка из EV, EMNV и мембранных наночастиц и значительно повышает обнаружение основных белковых биомаркеров (HSP70, CD63, CD81) и β-актина, а также РНК, из всех типов БН. Затем мы продемонстрировали, что протокол на основе сапонина актуален для измерения количества загруженных комплексов CRISPR/Cas9 в БН. По сравнению с ранее описанным протоколом выделения белков из БН на основе RIPA, новый протокол на основе сапонина стабильно обеспечивает ~1,5–4-кратное увеличение обнаружения белков. Кроме того, добавление десятикратных объемов RIPA-буфера к образцам для лизиса приводит к разбавлению образца и может уменьшить количество анализируемого образца в тех случаях, когда объем исходного материала ограничен (например, ограниченный объем лунок геля при вестерн-блоттинге). Напротив, протокол с сапонином не приводит к разбавлению образца (увеличение объема образца на ~10 %). Надежность и точность обнаружения РНК в настоящее время снижена из-за загрязнений, присутствующих в изолятах РНК, полученных с помощью TRIzol и методов, основанных на преципитации. Наши данные еще раз подчеркивают важность использования сапонина и правильной очистки изолятов РНК для точного количественного анализа РНК в БН. Наконец, в данном исследовании впервые получены Рамановские спектры и SERS для всех основных типов БН, что в совокупности позволяет выявить структурные и композиционные различия в жесткости мембран БН. EMNV и гибридные наночастицы демонстрируют более высокое количество белков, которое коррелирует с величиной высвобожденного β-актина и HSP70. EMNV и гибридные наночастицы также содержат больше РНК. Анализ липидов выявил более высокую жесткость мембран emNV, а содержание липидов в БН соответствует более выраженному эффекту сапонина на высвобождение белка из этих БН. В целом описанные нами результаты и протоколы предлагают новое представление о свойствах БН и призывают к использованию разработанного подхода на основе сапонина для точного и надежного обнаружения белков и РНК в БН.

Литература

1. Yáñez-Mó M., Siljander P. R.-M., Andreu Z. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions // J. Extracell. Vesicles. 2015. Vol. 4. P. 27066.

2. Brezgin S., Kostyusheva A., Ponomareva N. et al. Hydroxychloroquine Enhances Cytotoxic Properties of Extracellular Vesicles and Extracellular Vesicle — Mimetic Nanovesicles Loaded with Chemotherapeutics // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15 (2). P. 1–10.

3. Herrmann I. K., Wood M. J. A., Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform // Nat. Nanotechnol. 2021. Vol. 16. P. 748–759.

4. Brezgin S., Parodi A., Kostyusheva A. et al. Technological aspects of manufacturing and analytical control of biological nanoparticles // Biotechnol. Adv. 2023. Vol. 64. 108122.

5. Lins P. M.P., Pirlet E., Szymonik M. et al. Manufacture of extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells // Trends Biotechnol. 2023. Vol. 41. P. 965–981.

6. Kumar M. A., Baba S. K., Sadida H. Q. et al. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases // Signal Transduct. Target. Ther. 2024. Vol. 9. P. 27.

7. Tao S.-C., Rui B.-Y., Wang Q.-Y. et al. Extracellular vesicle-mimetic nanovesicles transport LncRNA-H19 as competing endogenous RNA for the treatment of diabetic wounds // Drug Deliv. 2018. Vol. 25. P. 241–255.

8. Toledano Furman N. E., Lupu-Haber Y., Bronshtein T. et al. Reconstructed stem cell nanoghosts: a natural tumor targeting platform // Nano Lett. 2013. Vol. 13. P. 3248–3255.

9. Parodi A., Quattrocchi N., Van De Ven A.L. et al. Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions // Nat. Nanotechnol. 2013. Vol. 8. P. 61–68.

10. Ponomareva N., Brezgin S., Karandashov I., A. et al. Swelling, Rupture and Endosomal Escape of Biological Nanoparticles Per Se and Those Fused with Liposomes in Acidic Environment // Pharmaceutics. 2024. Vol. 16. P. 667.

11. Sato Y. T., Umezaki K., Sawada S. et al. Engineering hybrid exosomes by membrane fusion with liposomes, Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 21933.

12. Shao H., Im H., Castro C. M. et al. New technologies for analysis of extracellular vesicles // Chem. Rev. 2018. Vol. 118. P. 1917–1950.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-109

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА В СОСТАВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

PROSPECTS FOR THE USE OF ABSCISIC ACID AS A BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE IN THE COMPOSITION OF FUNCTIONAL PRODUCTS

А. В. Торопова, А. А. Копылова, А. Ю. Павлова, Н. В. Баракова

Санкт-Петербургский государственный технологический институт

A. V. Toropova, A. A. Kopylova, A. Yu. Pavlova, N. V. Barakova

Saint Petersburg State Institute of Technology

✉ atoropova1380@gmail.com

Аннотация

Абсцизовая кислота (АБК), являясь фитогормоном, также выполняет ряд функций в клетках млекопитающих, участвуя в метаболизме глюкозы и инициации воспаления. Благодаря этому АБК является перспективным действующим веществом для профилактики и лечения метаболических нарушений, таких как сахарный диабет второго типа (СД 2-го типа), а использование ее в составе функциональных продуктов питания позволит снизить риски и сделать доступной для широкого использования. В работе было доказано, что АБК в составе экстракта из кожуры плодов вида *Eureka Lemon* способна снижать показатель постпрандиальной глюкозы, что указывает на возможность ее применения для предотвращения и терапии СД 2-го типа.

Abstract

Abscisic acid (ABA), being a phytohormone, also performs a number of functions in mammalian cells, participating in glucose metabolism and initiation of inflammation. Due to this, ABA is a promising active ingredient for the prevention and treatment of metabolic disorders, such as type 2 diabetes mellitus (type 2 diabetes), and its use in functional foods will reduce risks and make it available for widespread use. In this work, it was proved that ABA in the composition of an extract from the peel of Eureka Lemon fruits is able to reduce the index of postprandial glucose, which indicates the possibility of its use for the prevention and therapy of type 2 diabetes.

Абсцизовая кислота (АБК) — фитогормон, изопреноид, регулирующий рост и развитие растений, а также их реакцию на неблагоприятные факторы среды. АБК является одним из древнейших способов адаптации организмов к наземной среде, встречающийся еще у цианобактерий и контролирующий различные ответы на стресс [1]. АБК синтезируется и у млекопитающих, в том числе у человека, являясь экзогенным провоспалительным фактором, а также эндогормоном, который синтезируется в ответ на внешние раздражители. Абсцизовая кислота может выступать в качестве биологически активного вещества, и в связи с этим встает вопрос о том, какими именно функциональными и терапевтическими свойствами она обладает.

У АБК есть несколько механизмов действия на клетки млекопитающих, активация воспалительной реакции у гранулоцитов и кератиноцитов, а также освобождение инсулина из β-клеток поджелудочной железы. Кроме того, у клеток, чувствительных к АБК, аутокринное воздействие этого соединения способствует увеличению функциональной активности, специфичной для каждого типа клеток [2]. Данные свойства делают абсцизовую кислоту перспективным инструментом для профилактики и терапии различных метаболических заболеваний.

Одним из самых распространенных метаболических заболеваний является сахарный диабет 2-го типа, хроническое нарушение обмена веществ, вызванное нарушением секреции инсулина и резистентностью к инсулину, а также патологические состояния ему предшествующие, такие как гипергликемия и гиперинсулинемия. На сегодняшний день эта проблема затрагивает около 10 % всего населения и значительно сокращает продолжительность и качество жизни человека [3].

Наиболее эффективный способ борьбы с распространением заболеваний, имеющих глобальный характер, — это профилактика их развития и коррекция патологий на ранней стадии. Проблема заключается в пренебрежении симптомами преддиабетического состояния (висцеральное ожирение, повышенная утомляемость, жажда) и, соответственно, в поздней диагностике. Необходимо доступное и безопасное решение, которым могут стать функциональные продукты, где в качестве действующего вещества выступает экстракт, содержащий абсцизовую кислоту.

© А. В. Торопова, А. А. Копылова, А. Ю. Павлова, Н. В. Баракова, 2024

Функциональный пищевой продукт (ФП) — пищевой продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения, снижающий риск развития заболеваний, связанных с питанием, сохраняющий и улучшающий здоровье за счет наличия в его составе физиологически функциональных пищевых ингредиентов [4].

Использование растительного экстракта, включенного в состав ФП, а не чистого вещества позволит снизить вероятность возникновения побочных эффектов за счет поступления части АБК в связанном виде.

В качестве сырья для извлечения АБК была выбрана кожура плодов вида *Eureka Lemon*, так как это оптимальный вариант по содержанию АБК и доступности на российском рынке. Экстракцию абсцизовой кислоты проводили путем мацерации и дальнейшего обезвоживания.

Было проведено определение эффективности влияния экстракта по изменению концентрации глюкозы в крови. В рамках исследования принимали участие 10 здоровых человек (6 женщин и 4 мужчин) с нормальными уровнями глюкозы и инсулина в крови. На протяжении эксперимента было обнаружено, что абсцизовая кислота, содержащаяся в экстракте, демонстрировала снижение гликемического индекса (ГИ): при добавлении 1 мл экстракта ГИ снизился на 15 %, при добавлении 2 мл — на 24 %, а при добавлении 3 мл — на 26 %.

Результаты позволяют утверждать, что экстракт кожуры плодов вида *Eureka Lemon*, содержащий АБК, за счет снижения постпрандиальной глюкозы способен минимизировать вред при резких изменениях уровня глюкозы крови во время приема пищи, что способствует торможению развития гипергликемии и инсулинорезистентности.

Распространенность преддиабетических и диабетических состояний среди населения с каждым годом увеличивается, сокращая продолжительность и ухудшая качество жизни человека. Перспективным способом профилактики и терапии таких метаболических нарушений могут стать функциональные продукты с абсцизовой кислотой в качестве действующего вещества. В ходе эксперимента была доказана эффективность низких доз АБК в составе экстракта в снижении глюкозного пика для профилактики возникновения гипергликемии.

Литература

1. Magnone M. et al. Abscisic acid: A conserved hormone in plants and humans and a promising aid to combat prediabetes and the metabolic syndrome // Nutrients. 2020. Vol. 12, No. 6. P. 1724.

2. Bruzzone S. et al. Abscisic acid is an endogenous cytokine in human granulocytes with cyclic ADP-ribose as second messenger // Proc. National Acad. Sci. 2007. Vol. 104, No. 14. P. 5759–5764.

3. Standl E. et al. The global epidemics of diabetes in the 21st century: Current situation and perspectives // Eur. J. Preventive Cardiology. 2019. Vol. 26, No. 2_suppl. P. 7–14.

4. ГОСТ Р 52349-2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения: утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 31 мая 2005 г. No 138-ст. М.: Стандартинформ, 2008.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-110

ПАРАМЕТРЫ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНОДА НА ОСНОВЕ ОКСИДА ГРАФЕНА *

PARAMETERS OF MICROBIAL FUEL CELL USING MODIFIED ANODE BASED ON GRAPHENE OXIDE

В. В. Федина, А. А. Ковалева, С. В. Алферов

Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, НИЦ «БиоХимТех» ТулГУ

V. V. Fedina, A. A. Kovaleva, S. V. Alferov

Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, SRC "BioChemTech" Tula State University

✉ agapovaweronica@yandex.ru

Аннотация

Биотопливные элементы — это активно развивающая технология, которая предполагает использование живых систем для производства электроэнергии. В данной работе применяли мембранные фракции бактерий *Gluconobacter oxydans* на электродах, модифицированных оксидом графена. Модификация графитового войлока приводит к увеличению его электрохимических свойств, благодаря которым ускоряется процесс переноса электронов между электродом и биокатализатором.

Abstract

Biofuel cells are an actively developing technology that involves the use of living systems to generate electricity. In this work, membrane fractions of *Gluconobacter oxydans* bacteria were applied on electrodes modified with graphene oxide. The modification of graphite felt leads to an increase in its electrochemical properties, due to which the process of electron transfer between the electrode and the biocatalyst is increased.

Микробные топливные элементы (МТЭ) — это устройства, в которых используют различные микроорганизмы в качестве биокатализаторов для выработки электрической энергии за счет окисления субстратов. Перенос электронов от биокатализатора к электродам считается одним из ключевых аспектов в МТЭ. Анодный перенос электронов в МТЭ является одним из этапов, ограничивающих скорость работы биотопливного элемента (БТЭ), поэтому подбор биокатализаторов и модификация электродов играет важную роль в переносе заряда [1].

Грамотрицательные бактерии довольно широко изучены, их путь переноса электронов классифицируется как прямой (через мембраноассоциированные цитохромы или проводящие пили) или опосредованный (через окислительно-восстановительные медиаторы) [2]. В работе использовали ферментативные каскады бактерий *G. oxydans*. В их мембране находится комплекс ферментов, благодаря которым происходит окисление субстратов, что в результате приводит к производству электроэнергии. Для закрепления биокатализатора на поверхности электрода используют различные типы модификаций. В работе графитовый войлок (ГВ) модифицировали оксидом графена (ОГ) и восстановленным ОГ (ВОГ) [3].

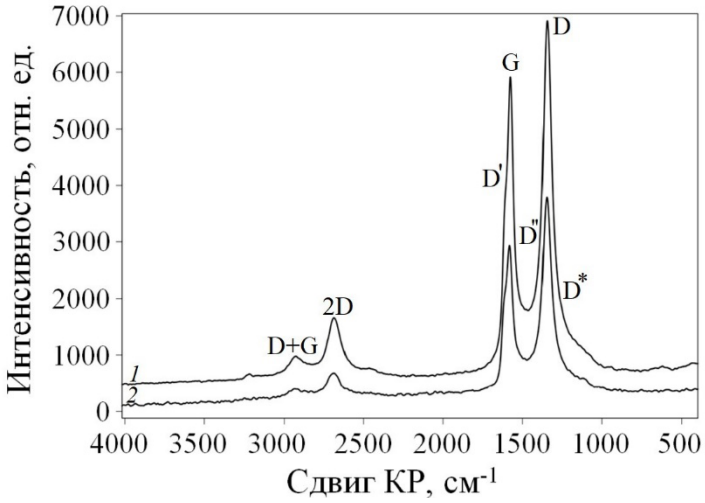
ОГ — углеродный наноматериал, представляющий собой sp^2-гибридизованные атомы углерода в виде гексагональной решетки с включениями sp^3-гибридизованных атомов углерода, связанных с кислородсодержащими функциональными группами на базальной и краевой плоскостях [4]. Наличие в ОГ функциональных групп, обуславливает его кислотно-основные свойства, гидрофильность, диспергируемость в полярных растворителях и однородность распределения в полимерах. Это определяет перспективность применения ОГ для создания композитных материалов на основе полимерных матриц, электрохимических сенсоров и топливных элементов [5], а также в катализе [4]. Модификация ГВ такими материалами приводит к увеличению электрохимически активной площади поверхности, эффективному закреплению биокатализатора и к ускорению переноса электронов между биоматериалом и анодом.

В работе проводили оценку электродов, модифицированных разными способами, с помощью методов спектроскопии комбинационного рассеивания (СКР) (см. рисунок) и БТЭ.

КР-спектры ОГ (см. рисунок) содержат набор характеристических полос: G (1580 $см^{-1}$) свидетельствует о наличии sp^2-гибридного углерода, D (1345 $см^{-1}$) характеризует структурные дефекты углеродной решетки

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (№ FEWG-2024-0003).

© В. В. Федина, А. А. Ковалева, С. В. Алферов, 2024



КР-спектры: *1* — ВОГ, *2* — ОГ

(sp^3-дефекты) ОГ. Полоса D», располагающаяся между полосами D и G, связана с аморфной фазой в ОГ. Восстановление кислородсодержащих групп ОГ приводит к снижению соотношения $S_{D»}/S_G$, свидетельствующее об уменьшении содержания аморфной фазы [6] с 0,4 ± 0,1 в ОГ до 0,27 ± 0,07 в ВОГ.

После оценки модифицированных электродов подготавливали макеты БТЭ. На ГВ наносили мембранные фракции бактерий *G. oxydans* и закрепляли электропроводящей матрицей на основе хитозана с углеродными нанотрубками. Результаты измерений приведены в таблице.

Параметры макетов БТЭ с модифицированными анодами

Параметры БТЭ	Анод на основе ОГ	Анод на основе ВОГ
E, мВ	90 ± 6	120 ± 6
R, кОм	3,5	6,3
$P_{удел}$ (*10^{-5}), Вт/м^2	4,34	5,89

Примечание. E — генерируемый потенциал в режиме открытой цепи;
R — внутреннее сопротивление ячейки БТЭ; $P_{удел}$ — удельная мощность БТЭ.

Работа БТЭ с модифицированным анодом ВОГ приводит к увеличению удельной мощности практически в 1,5 раза, что подтверждается методом СКР.

Литература

1. Schröder U. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency // Phys. Chem. Chem. Phys. 2007. Vol. 9 (21). P. 2619–2629.

2. Liu X., Shi L., Gu J. D. Microbial electrocatalysis: redox mediators responsible for extracellular electron transfer // Biotechnol. Adv. 2018. Vol. 36 (7). P. 1815–1827.

3. Gomaa O. M. et al. Characterization of a biosurfactant producing electroactive Bacillus sp. for enhanced Microbial Fuel Cell dye decolourisation // Enzym Microb. Technol. 2021. Vol. 147. P. 109767.

4. Brisebois P. P., Siaj M. Harvesting graphene oxide–years 1859 to 2019: a review of its structure, synthesis, properties and exfoliation // J. Mater. Chem. C. 2020. T. 8 (5). P. 1517–1547.

5. Javed R. M.N. et al. Recent developments in graphene and graphene oxide materials for polymer electrolyte membrane fuel cells applications // Renewable Sustainable Energy Rev. 2022. T. 168. P. 112836.

6. De Silva K. K. H., Huang H. H., Yoshimura M. Progress of reduction of graphene oxide by ascorbic acid // Appl. Surf. Sci. 2018. Vol. 447. P. 338–346.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-111

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* MG1655 В ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯТОВ КРЕМНИЯ: ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗ, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ОЦЕНКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ *

ENCAPSULATION OF ESCHERICHIA COLI MG1655 BACTERIA IN HYDROGELS BASED ON SILICON POLYETHYLENE GLYCOLATES: SOL-GEL SYNTHESIS, STRUCTURAL FEATURES AND RESPIRATORY ACTIVITY ESTIMATION

Е. С. Филиппова[1], А. Н. Звонарев[2], Д. Г. Лаврова[1]

[1] *Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, НИЦ «БиоХимТех» ТулГУ*
[2] *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Пущино*

E. S. Filippova[1], A. N. Zvonarev[2], D. G. Lavrova[1]

[1] *Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, SRC "BioChemTech" Tula State University*
[2] *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino*

✉ katya.filippova010197@gmail.com

Аннотация

Исследована возможность применения органо-неорганических гидрогелей на основе полиэтиленгликолятов кремния (Si-ПЭГ) для эффективного инкапсулирования грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* MG1655. Инкапсулирование проводилось в условиях одностадийного золь-гель синтеза. Подтверждено образование оболочки из Si-ПЭГ вокруг клеток. Клетки микроорганизмов сохраняют свою жизнеспособность после инкапсулирования более одной недели.

Abstract

The possibility of using organo-inorganic hydrogels based on silicon polyethylene glycolates (Si-PEG) for effective encapsulation of Gram-negative bacteria Escherichia coli MG1655 was investigated. Encapsulation was carried out under the conditions of one-step sol-gel synthesis. The formation of a Si-PEG shell around the cells was confirmed. Microbial cells remain viable after encapsulation for more than 1 week.

В биотехнологических процессах инкапсулированные микроорганизмы используются для обеспечения стабильности и повышения эффективности ферментации и получения ценных вторичных метаболитов. Особенностью использования целых клеток микроорганизмов, по сравнению с отдельными ферментами, является сохранение всех белковых комплексов, транспортных механизмов и коферментов, необходимых для биохимических реакций, которые дорого и трудоемко воспроизводить *in vitro*. Инкапсуляция предотвращает потерю мутантных штаммов, что важно как с биотехнологической, так и с экологической точки зрения. Перспективными матрицами для инкапсуляции живых клеток являются органо-неорганические гидрогели на основе кремнезема [1], которые формируются в мягких условиях золь-гель синтеза, захватывая при этом клетки в сетевую трехмерную структуру. Полиэтиленгликоляты кремния используются в качестве прекурсоров при синтезе кремнийорганических композитов для медицинских и биотехнологических применений [2, 3]. Их преимуществом перед традиционными предшественниками алкоксиланами и алкилалкоксисиланами на основе одноатомных спиртов является то, что гидрофильные полимеры не вызывают денатурации и (или) осаждения биологических макромолекул. Впервые полиэтиленгликолят кремния был применен для инкапсуляции метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559 [4].

В данной работе в качестве объекта инкапсулирования в условиях одностадийного золь-гель синтеза в гидрогели из полиэтиленгликолята кремния использовали грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* MG1655 (рис. 1), которые являются модельной системой для генетических исследований [5], получения рекомбинантных белковых молекул [6] за счет простоты культивирования, быстрого роста и возможности перенаправления метаболических путей бактерии, что позволяет использовать их в методах очистки окружающей среды, производства биотоплива.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-24-20032) и правительства Тульской области.
© Е. С. Филиппова, А. Н. Звонарев, Д. Г. Лаврова, 2024

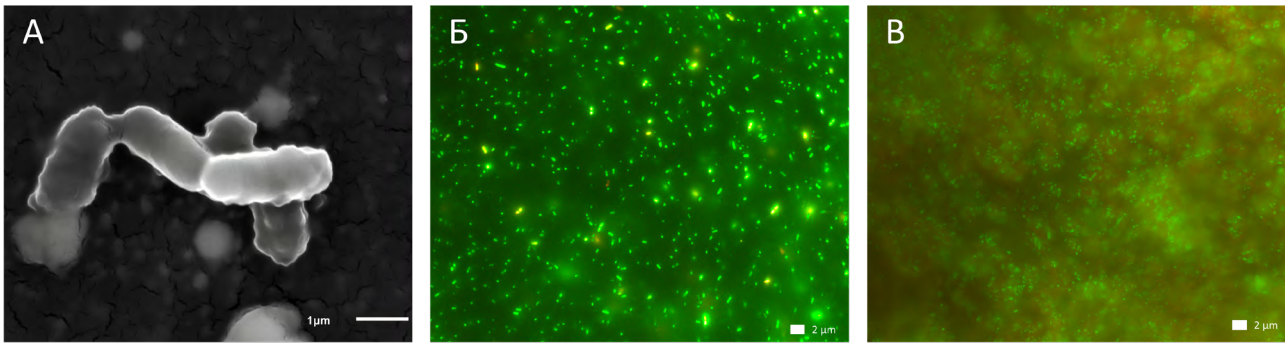


Рис. 1. Оценка структурных особенностей и жизнеспособности инкапсулированных в гидрогели из Si-ПЭГ бактерий *Escherichia coli* MG1655. *А* — СЭМ-фотография инкапсулированных в гидрогели из Si-ПЭГ бактерий *Escherichia coli* MG1655. Флуоресцентная микроскопия: *Б* — суспензия свободных бактерий *Escherichia coli* MG1655, цитохимическая окраска с помощью флуоресцентного красителя LIVE/DEAD™ BacLight™; *В* — инкапсулированные в гидрогели из Si-ПЭГ бактерии *Escherichia coli* MG1655, цитохимическая окраска с помощью флуоресцентного красителя LIVE/DEAD™ BacLight™

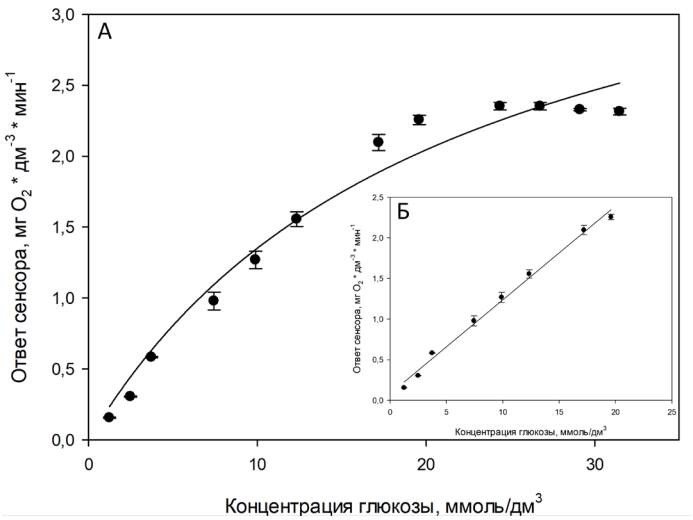


Рис. 2. Градуировочная зависимость (*А*) и линейная область зависимости (*Б*) ответа сенсора от концентрации субстрата для бактерий *Escherichia coli* MG1655

На СЭМ-фотографии наблюдаются бактерии, покрытые оболочкой из гидрогеля. При изучении жизнеспособности бактериальной культуры установлена высокая выживаемость клеток после иммобилизации в гидрогель из Si-ПЭГ.

Дыхательную активность инкапсулированных в гидрогель из Si-ПЭГ бактерий определяли с использованием биосенсорного подхода. Такой подход широко используется при разработке целоклеточных биосенсоров и обеспечивает оперативность и надежность в получении количественных характеристик биокатализаторов — иммобилизованных микроорганизмов. Гидрогель с клетками наносили на поверхность кислородного электрода типа Кларка и измеряли скорость изменения кислорода в предэлектродном пространстве при введении субстрата (1М глюкоза) (рис. 2).

Для биосенсора на основе инкапсулированных бактерий определены характеристики чувствительности и стабильности: коэффициент чувствительности составил 0,116 ± 0,002 мг O_2×ммоль$^{-1}$×мин$^{-1}$, диапазон определяемых концентраций 1–21 ммоль/дм^3, операционная стабильность — 13 %, долговременная стабильность — 9 суток. Полученный биогибридный материал уступает по чувствительности (0,85 ± 0,08 мг O_2×ммоль$^{-1}$×мин$^{-1}$) дрожжевым клеткам *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, инкапсулированным в ту же матрицу [4], однако по стабильности превышают показатели с дрожжевыми клетками, что важно при разработке стабильных биокатализаторов в области биотехнологии, экологии и медицины.

Литература

1. Shchipunov Y. Biomimetic Sol–Gel Chemistry to Tailor Structure, Properties, and Functionality of Bionanocomposites by Biopolymers and Cells // Mater. 2023. Vol. 17, No. 1. P. 224.

2. Khonina T. G. et al. Mechanism of structural networking in hydrogels based on silicon and titanium glycerolates // J. Colloid Interface Sci. 2012. Vol. 365, No. 1. P. 81–89.

3. Shkryl Y. N. et al. Biomimetic Synthesis of Nanosized Silica Structures on a Substrate with Silicatein // Russ. J. Bioorg Chem. 2018. Vol. 44, No. 4. P. 469–471.

4. Lavrova D. G. et al. Biocompatible Silica-Polyethylene Glycol-Based Composites for Immobilization of Microbial Cells by Sol-Gel Synthesis // Polymers. 2023. Vol. 15, No. 2. P. 458.

5. Croxen M. A., Finlay B. B. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity // Nat. Rev. Microbiol. 2010. Vol. 8, No. 1. P. 26–38.

6. Blount Z. D. The unexhausted potential of E. coli // eLife. 2015. Vol. 4. P. e05826.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-112

РЕКОМБИНАНТНЫЙ СТРЕПТАВИДИН ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ

RECOMBINANT STREPTAVIDIN FOR CHEMICAL MODIFICATION

А. А. Фомина

ООО «НПФ “МИРАЙКОН”», Санкт-Петербург

A. A. Fomina

NPF “MYRAIKON”, LLC, Saint Petersburg

✉ Fominaalina13608@mail.ru

Аннотация

Стрептавидин находит широкое применение в задачах биотехнологии благодаря стабильной связи с биотином. Чаще всего для использования этого свойства создаются конъюгаты стрептавидина с другими белками: пероксидазой хрена, антителами и т. д. [1]. Поэтому в ходе работы нами был получен стабильный вариант стрептавидина в *Escherichia coli* с линкером для удобной химической модификации и конъюгации.

Abstract

Streptavidin is widely used in biotechnology due to it’s stable binding with biotin. Most often, streptavidin conjugates with other proteins: horseradish peroxidase, antibodies and etc. [1]. Therefore, in the course of our work, we obtained a stable variant of streptavidin to produce in Escherichia coli with a linker for chemical modification and conjugation.

Стрептавидин представляет собой гомотетрамерный, состоящий из четырех одинаковых субъединиц белок массой около 60 кДа. В природе этот белок экспрессируется в бактерии *Streptomyces avidinii*. Основным свойством стрепатавидина является его высокое сродство к биотину (B7 или H). Эта связь устойчива к различным детергентам, таким как SDS и Triton X-100, органическим растворителям, денатурантам и экстремальным значениям pH.

Его третичная и четвертичная структура может быть представлена как гомотетрамер, состоящий из четырех структур β-бочонков. В первую очередь высокое сродство к биотину обусловлено формированием большого количества Ван-дер-ваальсовых взаимодействий в области каталитического центра. Известно, что стрептавидин проявляет свою активность исключительно в тетрамерной форме, это связано с формированием гидрофобного кармана в области присоединения биотина. Таким образом, стрептавидину для проявления активности критически важно собираться в правильные четвертичные структуры [2].

Получение рекомбинантного стрептавидина

Генетическая последовательность стрептавидина была оптимизирована для экспрессии в *E. coli* и помещена в плазмидный вектор pET30b. Дополнительно к последовательности нативного белка с N-конца в генетическую конструкцию был добавлен линкер: SSGENLYFQGS. В качестве штамма продуцента был выбран штамм BL21. Последовательность линкера выбрана таким образом, чтобы содержать наиболее часто используемые для химической модификации аминокислоты. Содержащие аминогруппу: аспарагин и глутамин; содержащие карбоксильную группу: глютаминовая кислота. Кроме того, в линкере содержится тирозин, что позволяет вносить радиоактивную метку йодом [3].

Для очистки белка использовался сорбент Ni-AZUR. Элюция стрептавидина происходила в буфере PBS 50mM pH 7, Tween 20 0,2 %, имидазол 500mM. В дальнейшем проводился диализ белка в буфер PBS 50mM pH 7, Tween 20 0,01 %.

Проверка активности стрептавидина в отношении биотина проводилась следующим образом.

1. На планшет в течение 2 ч при 37 °C сорбировался биотинилированный альбумин, после чего планшет промывался PBS-T буфером.

2. В эти же лунки добавлялся стрептавидин в разных концентрация, начиная от 10 мкг/мл до 0,64 нг/мл, и инкубировался в течение 30 мин. После инкубации лунки промывались PBS-T буфером.

© А. А. Фомина, 2024

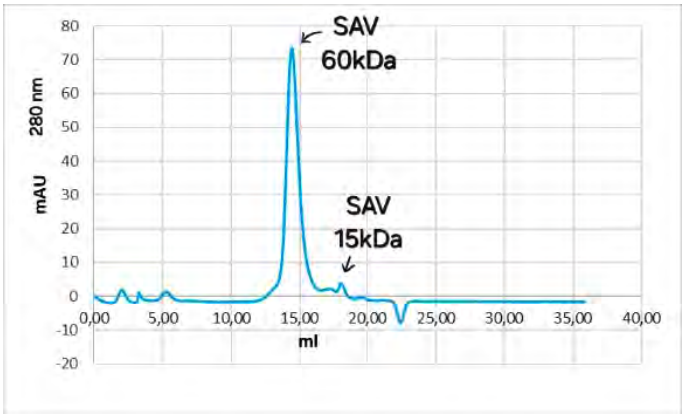


Рис. 1. Результат гель-фильтрации стрептавидина (SAV) на сорбенте Superose 12

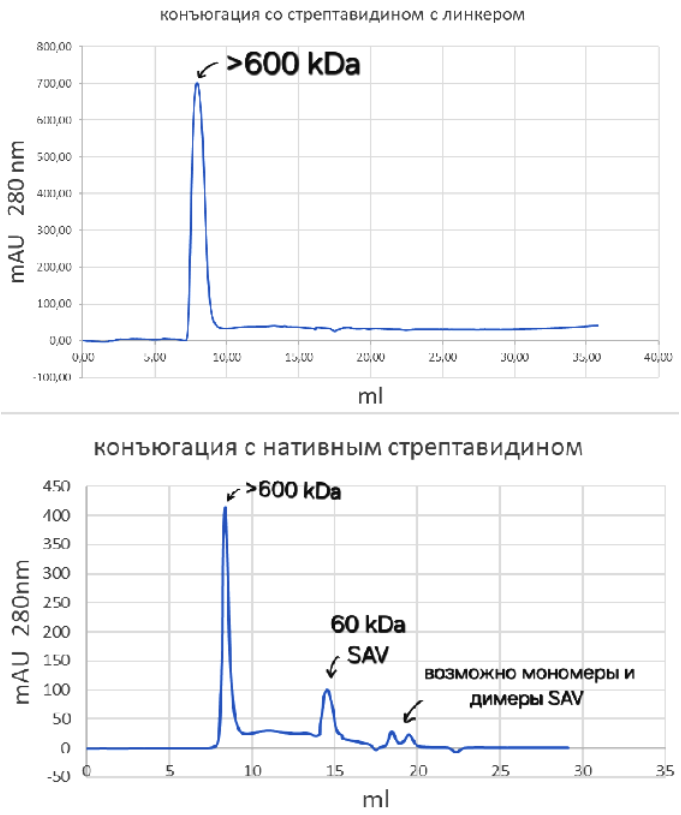


Рис. 2. Сравнение результата конъюгации нативного и модифицированного стрептавидина (SAV)

3. Добавлялась бутилированная пероксидаза хрена 50 нг/мл и инкубировалась в течение 30 мин с последующей промывкой.

4. Для визуализации результата в лунки добавлялся ТМБ и инкубировался до проявления окраски в течение 15 мин, затем добавлялся стоп-реагент.

Результаты и обсуждения

После получения нескольких стабильных партий стрептавидина был проведен тест на сохранение активности при хранении на 37 °C в течение 2 месяцев. В результате оказалось, что белок не потерял свою активность, в отличие от коммерческого аналога, активность которого была снижена в 5 раз относительно изначальной. Кроме того, для проверки фолдинга белка и сборки его в тетромерную форму была проведена гель-фильтрация на сорбенте Superose 12 (рис. 1). Видно, что стрептавидин практически полностью собирается в тетрамер.

Также для удобной транспортировки белка стрептавидин был лиофилизирован. После месяца хранения в сухом виде при комнатной температуре белок не потерял активность.

Так как в нашей работе отдельное внимание было уделено возможности конъюгации стрептавидина, для этого был разработан линкер, содержащий часто используемые для сшивок аминокислоты. Для проверки вклада линкерной последовательности была проведена конъюгация через EDC в течение 2 ч при pH 4,9 в MES-буфере стрептавидина с аминированным декстраном [3]. В результате в сравнении со стрептавидином с нативной последовательностью аминокислот в тех же условиях удалось получить более высокий выход продукта (рис. 2). Оценка качества коньюгата проводилась по протоколу оценки активности стрептавидина, описанного ранее.

Таким образом, удалось получить пригодный для химической модификации стрептавидин.

Литература

1. Dundas C. M., Demonte Daniel, Park S. Streptavidin–biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. Vol. 97. P. 9343–9353.

2. Weber P. C. et al. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin // Sci. 1989. Vol. 243 (4887). P. 85–88.

3. Hermanson G. T. Bioconjugate techniques. Academ. Press. 2013. P. 216.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-113

ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO HELLEBORUS CAUCASICUS* A. BR. *

FEATURES OF THE INDUCTION OF MORPHOGENESIS UNDER CONDITIONS *IN VITRO HELLEBORUS CAUCASICUS* A. BR.

Г. А. Цатурян, В. И. Маляровская

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр РАН», Сочи

G. A. Tsaturyan, V. I. Malyarovskaya

Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre RAS, Sochi

✉ grisha.tsaturyan@yandex.ru

Аннотация

В статье обоснована актуальность и необходимость сохранения редкого вида, эндемичного вида природной флоры Северо-Западного Кавказа *Helleborus caucasicus* A. Br. В работе были изучены влияния стерилизующих веществ на жизнеспособность семян и действие регуляторов роста на процессы морфогенеза *Helleborus caucasicus*.

Abstract

The article substantiates the relevance and necessity of preserving a rare species, an endemic species of the natural flora of the North-West Caucasus Helleborus caucasicus A. Br. In this work, the effects of sterilizing substances on seed viability and the effect of growth regulators on the morphogenic processes of Helleborus caucasicus were studied.

Helleborus L. — небольшой род семейства Ranunculaceae, включающий около 19 видов, по информации Plant List — всего 13 видов [1]. Все виды, принадлежащие к роду *Helleborus*, декоративны, к тому же корни и листья этих растений содержат биологически активные вещества, используемые в фармакологии. При этом многие виды морозника, включая и редкий вид природной флоры Западного Кавказа *Helleborus caucasicus* A. Br., включены в Красные книги [2, 3]. Для сохранения и размножения разных видов этого рода разрабатывают методы клонального микроразмножения в условиях *in vitro* [4]. Цель исследований — изучение влияния стерилизующих веществ на жизнеспособность семян и действия регуляторов роста на процессы морфогенеза *Helleborus caucasicus* A. Br. Объектами исследования служили семена *H. Caucasicus*. Сбор семян осуществляли в сроки их созревания, в период с середины мая по первую декаду июня, на территории отдела ботанического сада «Дерево Дружбы». В работе использовали методы клонального микроразмножения, основанные на общепринятых классических приемах работы с культурами изолированных тканей и органов растений. Для поверхностной стерилизации эксплантов в качестве стерилизующих агентов были использованы 96%-й раствор этанола (C_2H_6O), 10%-й H_2O_2, 5–20%-й раствор гипохлорита натрия (NaClO), «Доместос», «Мультидез» в различном составе и времени экспозиции. Для регуляции процессов индукции морфогенеза в питательную среду по прописи Мурасиге — Скуга вводили регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (БАП), индолил-3-масляную кислоту (ИМК), гиббереллиновую кислоту в различных концентрациях и сочетаниях. Отработан этап введения в культуру *in vitro* эксплантов (семян) *H. Caucasicus*. Определен оптимальный состав стерилизующих веществ и их экспозиций (спирт этиловый 96 % 1 мин и белизна 10 % 10 мин), при котором выход стерильных эксплантов составил 100 %.

Установлено, что добавление в питательную среду различных типов и концентраций цитокининов и ауксинов стимулировало скорость и процент прорастания семян. Показано, что частота регенерации варьировала от 37,3 ± 5,4 % (в контроле) до 86,8 ± 9,4 %. Выявлено, что наиболее эффективной для получения высокого процента регенерации (86,8 ± 9,4 %) и наименее короткого периода прорастания семян оказалась среда с повышенным содержанием регуляторов роста 6-Бап-3 мг/л, ИМК-0,5 мг/л,

* Исследование выполнено в рамках реализации ГЗ ФИЦ СНЦ РАН (FGRW-2024-0003, номер госрегистрации 1240220 00093-1).

© Г. А. Цатурян, В. И. Маляровская, 2024

Литература

1. Plant List. URL: http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Ranunculaceae/Helleborus/ (accessed 16.03.2024).

2. Gabryszewska E. Propagation *in vitro* of *hellebores* (*Helleborus* L.) review // Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2017. Vol. 16 (1). P. 61–72.

3. Red Book of the Krasnodar Territory: Plants and mushrooms / Resp. ed. S.A. Litvinskaya. Ed. 2nd. Krasnodar: Design Bureau, 2017. 850 p.

4. Withers L.A. *In vitro* Collecting-Concept and Background // *In vitro* Collecting Techniques for Germplasm Conservation. Rome, 2002. P. 6–2.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-114

ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ШТАММА *ASPERGILLUS TERREUS*, ОБЛАДАЮЩЕГО АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ *FUSARIUM OXYSPORUM*

OBTAINING A NEW STRAIN OF *ASPERGILLUS TERREUS* HAVING ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *FUSARIUM OXYSPORUM*

В. А. Цыганов[1], Е. В. Глаголева[1], В. В. Джавахия[1], Т. М. Воинова[2]

[1]*Российский биотехнологический университет, Москва*
[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Москва*

V. A. Tsyganov[1], E.V.Glagoleva[1], V. V. Djavakhia[1], T. M. Voinova[2]

[1]*Russian Biotechnological University, Moscow*
[2]*All-Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow*

✉ ts_wladimir@inbox.ru

Аннотация

Путем ступенчатого индуцированного УФ-мутагенеза из штамма *A. terreus* 25–33 — низкопроизводительного продуцента мевинолина (35 мг/л) — получен штамм *Aspergillus terreus* 33–127, обладающий повышенной продуктивностью по целевому вторичному метаболиту (1170 мг/л). Проведены испытания инактивированной биомассы полученного штамма на способность подавлять рост фитопатогеннного тест-гриба *Fusarium oxysporum* МР-14-6. Было выявлено, что тестируемый продукт обладает ярко выраженной антифунгальной активностью, подавляя рост тест-культуры более чем на 50 %.

Abstract

Aspergillus terreus strain 33–127 was obtained from *A. terreus 25–33 strain,* a low-productivity producer of mevinoline (35 mg/l). The obtaining methodology was the stepwise induced UV mutagenesis. The obtained strain has increased productivity in the target secondary metabolite (1170 mg/l). The inactivated biomass of the resulting strain was tested for the ability to inhibit the growth of the phytopathogenic test fungus *Fusarium oxysporum* MP-14-6. It was revealed that the tested product has pronounced antifungal activity by suppressing the growth of the test culture up to over 50 %.

Постоянный поиск новых штаммов микроорганизмов, продуцирующих метаболиты с фунгицидными свойствами, позволяет расширить арсенал средств защиты растений и обеспечить устойчивое развитие сельского хозяйства. Известно о широком разнообразии биоактивных вторичных метаболитов, выделенных из изолятов мицелиального гриба *Aspergillus terreus*. Некоторые из них проявили себя в качестве потенциальных антифунгальных агентов [1]. Ранее сотрудниками ВНИИ фитопатологии РАН были выполнены исследования, посвященные изучению фунгицидного потенциала статина, продуцируемого *A. terreus* — мевинолина. Установлено, что добавление мевинолина к агаризованной среде приводило к подавлению роста фитопатогенов *M. Grisea* и *S. Nodorum in vitro* [2]. Важной задачей для разработки антифунгального препарата на основе мевинолина является создание штаммов *A. terreus*, способных сверхпродуцировать целевой метаболит.

Целью работы являлось проведение ступенчатого индуцированного ненаправленного УФ-мутагенеза исходного штамма *Aspergillus terreus* 25–33 для повышения его антифунгальной активности в отношении тест-гриба *Fusarium oxysporum*.

Повышение продуцирования мевинолина путем ненаправленного индуцированного ступенчатого УФ-мутагенеза

В качестве исходного использовался непатогенный штамм *A. terreus* 25–33 (продуктивность по мевинолину 35 мг/л, 7 сут.), предоставленный сотрудниками лаборатории молекулярной биологии ВНИИ фитопатологии РАН. Выращивание культуры *A. terreus* 25–33 происходило в течение 7 дней на агаризованной среде при 26 °С в термостате. Далее готовилась клеточная суспензия необходимой концентрации. Обработку клеточной суспензии УФ-лучами проводили с использованием эксимерной лампы XeBr модели BD_P мощностью 12,5 Вт, с длиной волны 220–280 нм. Время облучения подбирали путем построения корреляционных зависимостей времени облучения от выживаемости и количества образовавшихся мутантных колоний (рис. 1).

© В. А. Цыганов, Е. В. Глаголева, В. В. Джавахия, Т. М. Воинова, 2024

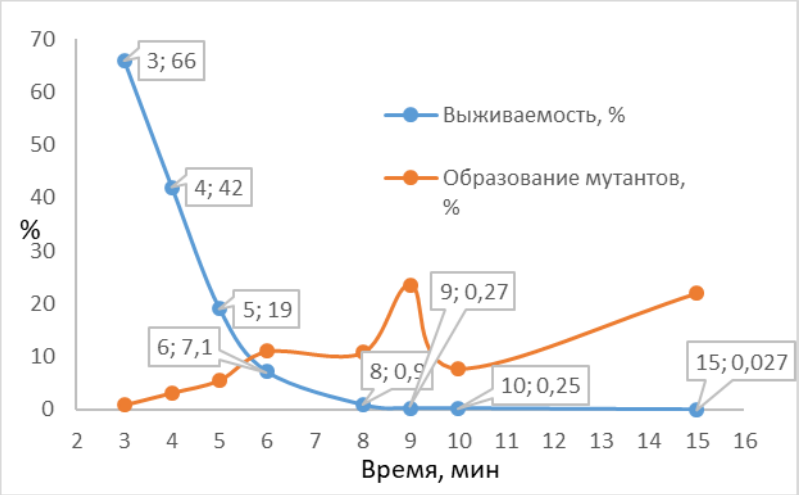


Рис. 1. Зависимость выживаемости колоний
и образования мутаций от времени УФ-облучения

Установлены следующие параметры: время облучения 9 мин, расстояние от лампы 40 см. Полученные изоляты размещались на агаризованных средах и инкубировались в течение 7 сут., после чего высевались в ферментационную среду и глубинным методом культивировались в колбах (150 мл) в течение 7 дней. Количественное содержание мевинолина в культуральной жидкости определялось методом ВЭЖХ с УФ-спектрометрическим детектированием. Далее для обработки УФ-лучами последовательно использовали колонии с измененной морфологией и повышенной продуктивностью, полученные в предыдущем мутагенезе. В результате был получен штамм *A. terreus* 33–127 с продуктивностью по мевинолину 1170 мг/л (7 сут.).

**Испытание лиофилизированной биомассы *A. terreus*
на антифунгальную активность**

Выращенную на 7-е сутки биомассу *A. terreus* инактивировали при температуре 80 °С в течение 30 мин и лиофилизировали. Полученную сухую биомассу использовали для определения антифунгальной активности методом радиального роста тест-патогена. Биомассу суспендировали и вносили в агаризованную среду до получения конечной концентрации — 1,0 г/л. В качестве тест-патогена использовался фитопатогенный штамм *Fusarium oxysporum* МР-14-6, предоставленный из Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов ВНИИ фитопатологии РАН. Подготавливали суточную культуру тест-патогена. Затем в чашках Петри с *F. oxysporum* стерильным сверлом вырезали в агаре диски диаметром 10 мм, которые помещали в центр чашек со средой КГА, содержащей тестируемую биомассу *A. terreus*. Чашки инкубировали при температуре 24 °С. Рост тест-грибов на чашках в контрольных и опытных вариантах замеряли на 3, 7 и 15-е сутки. Эксперименты были осуществлены в трех повторностях, для расчета брали среднеарифметическое значение. Антифунгальная активность проявилась во всех случаях (рис. 2).

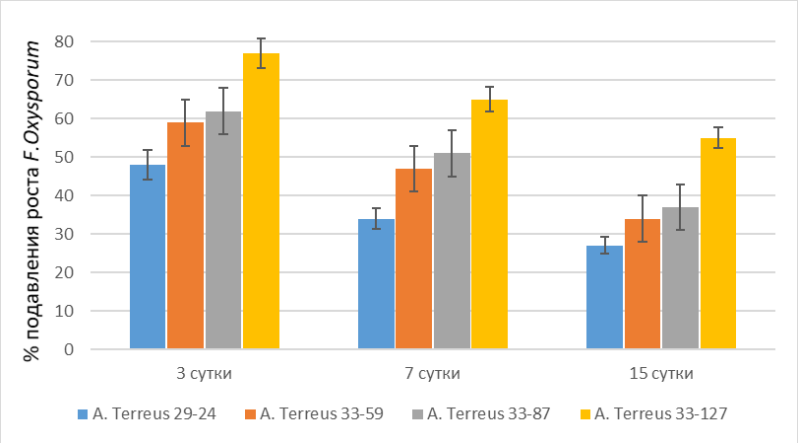


Рис. 2. Ингибирование роста тест-патогена
биомассой исследуемых изолятов *A. terreus*

Степень подавление роста тест-гриба биомассой полученного штамма *A. terreus* 33–127 превышала 50 %. Сила эффекта подавления роста коррелировала с уровнем продуцирования мевинолина исследуемым изолятом.

Результаты

В результате проведения последовательного индуцированного УФ-мутагенеза получили новый штамм *Aspergillus terreus* 33–127 с повышенной продуктивностью по меванолину. Проведенные испытания выявили антифунгальное влияние нового изолята на фитопатогенный гриб *Fusarium oxysporum*.

Литература

1. Amr K., Ibrahim N., Elissawy A. M., Singab A. N. B. Unearthing the fungal endophyte Aspergillus terreus for chemodiversity and medicinal prospects: a comprehensive review // Fungal Biology Biotechnol. 2023. Vol. 10, No. 1. P. 1–33.

2. Dzhavakhiya V. V., Petelina G. G. Lovastatin influence on phytopathogenic fungi // Agro XXI. 2008. No. 4–6. P. 33–35.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-115

НОВАЯ ГИБРИДНАЯ B-АМИЛАЗА: ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ*

A NOVEL HYBRID B-AMYLASE: CHARACTERISATION AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL

В. Г. Чепурко, С. П. Синеокий, Т. Л. Гордеева

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

V. G. Chepurko, S. P. Sineokiy, T. L. Gordeeva

National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow

✉ vgchepurko@gmail.com

Аннотация

В клетках *Komagataella phaffii* были экспрессированы гены, кодирующие β-амилазу из *Priestia megaterium* и гибридную β-амилазу Hyb1, состоящую из каталитического домена β-амилазы из *Priestia flexa* и крахмал-связывающего домена β-амилазы из *P. megaterium*. В отличие от β-амилазы из *P. megaterium*, фермент Hyb1 обладал расширенным рабочим интервалом pH и повышенной термостабильностью. Hyb1 сохранял около 67 % активности после инкубации в течение 40 мин при 50 °C.

Abstract

The genes encoding β-amylase from *Priestia megaterium* and hybrid β-amylase Hyb1, consisting of the catalytic domain of β-amylase *from Priestia flexa* and the starch-binding domain of β-amylase from *P. megaterium*, were expressed in *Komagataella phaffii* cells. In contrast to β-amylase from *P. megaterium*, the Hyb1 enzyme had an extended pH range and increased thermostability. Hyb1 retained about 67 % of activity after incubation for 40 min at 50 °C.

β-Амилаза (EC 3.2.1.2) — фермент класса гидролаз, расщепляющий α-1,4-гликозидные связи с нередуцирующего конца в молекулах глюканов с образованием мальтозы. β-Амилаза применяется в процессах осахаривания крахмала при производстве мальтозного сиропа и алкогольных напитков.

В промышленности чаще всего используют β-амилазы, экстрагированные из растительного сырья. Однако такие препараты отличаются нестабильностью при хранении, а также цена на них зависит от климатических условий, урожайности и спроса на посевные площади. Поэтому актуальной задачей является поиск β-амилаз с промышленно ценными свойствами и их получение с помощью микробиологического синтеза. Так, продуценты ферментов на основе метилотрофных дрожжей *K. phaffii* обладают рядом преимуществ и широко используются в промышленной биотехнологии.

Цель исследования — получение рекомбинантной β-амилазы с промышленно ценными свойствами.

В качестве реципиента был выбран штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287, обладающий высоким экспрессионным потенциалом. Ген, кодирующий β-амилазу из *P. megaterium*, был клонирован в состав интегративного экспрессионного вектора pPICZα в единой рамке считывания с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида α-фактора *Saccharomyces cerevisiae* и под контролем индуцибельного промотора PAOX1. В результате была получена плазмида pPICZα-amyB2.

Полученная плазмида была линеаризована при помощи эндонуклеазы рестрикции *Bgl*II и трансформирована в клетки *K. phaffii* методом электропорации. Были получены трансформанты, секретирующие β-амилазу в культуральную жидкость.

Максимальная активность рекомбинантной β-амилазы проявлялась при 40 °C и pH 6,5. Для промышленности ценность представляют β-амилазы, осуществляющие реакцию гидролиза крахмала при pH 5,0 и температурах 50–65 °C в течение 40 мин. Однако рекомбинантный фермент полностью инактивировался после инкубирования при указанных условиях и температуре 50 °C.

Для улучшения свойств рекомбинантной β-амилазы была получена гибридная β-амилаза Hyb1, состоящая из каталитического домена β-амилазы из *P. flexa* и крахмал-связывающего домена β-амилазы из *P. megaterium*. Ген, кодирущий Hyb1, был синтезирован методом перекрывающихся праймеров и клонирован в состав векто-

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (грант № 075-15-2019-1659) на базе БРЦ ВКПМ.

© В. Г. Чепурко, С. П. Синеокий, Т. Л. Гордеева, 2024

ра pPICZα, как описано выше. Получена плазмида pPICZα-hyb1, которую линеаризовали и трансформировали в клетки *K. phaffii*.

Гибридная β-амилаза Hyb1 демонстрировала максимальную активность при температуре 40 °C и pH 7,0. Обнаружено, что рабочий диапазон pH гибридной β-амилазы расширился: при pH 5,0 относительная активность Hyb1 составила 65 %, что на 25 % больше по сравнению с таковой для β-амилазы из *P. megaterium*. Кроме этого, в отличие от β-амилазы из *P. megaterium*, фермент Hyb1 обладал повышенной термостабильностью и сохранял около 67 % активности после инкубации в течение 40 мин при 50 °C.

Таким образом, замена каталитического домена β-амилазы из *P. megaterium* на каталитический домен из *P. flexa* позволила получить фермент с повышенной термостабильностью и pH, смещенным к значениям, используемым на производстве. Свойства полученной гибридной β-амилазы делают ее потенциально пригодной для использования в промышленных процессах.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-116

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ СЛАБОУСЕЧЕННОЙ (*MEDICAGO TRUNCATULA* GAERTN.), ПРОДУЦИРУЮЩИХ КУРИНЫЙ ИНТЕРФЕРОН-ГАММА *

A STUDY OF TRANSGENIC ALFALFA PLANTS (*MEDICAGO TRUNCATULA* GAERTN.) PRODUCING CHICKEN INTERFERON-GAMMA

К. П. Чернов, М. С. Бурлаковский, Е. С. Окулова, Д. Р. Аглиуллина, М. В. Падкина, Л. А. Лутова

Санкт-Петербургский государственный университет

K. P. Chernov, M. S. Burlakovsky, E. S. Okulova, D. R. Agliullina, M. V. Padkina, L. A. Lutova

Saint Petersburg State University

✉ kir.cherno@yandex.ru

Аннотация

В современной фармакологии наблюдается переход от низкомолекулярных препаратов к белковым, которые нарабатывают с применением трансгенных организмов-продуцентов. На примере растений-продуцентов гамма-интерферона мы демонстрируем преимущества и недостатки растительной системы экспрессии и методы повышения ее эффективности.

Abstract

In modern pharmacology, there is a transition from low-molecular-weight drugs to protein drugs, which are obtained using transgenic producing organisms. Using the example of gamma interferon producing plants, we demonstrate the advantages and disadvantages of the plant expression system, and methods to increase its effectiveness.

Интерфероны (IFN) — белки класса цитокинов, обладающие противовирусной, антибактериальной и противоопухолевой активностью, которые можно применять как самостоятельные препараты и в сочетании с антибиотиками и вакцинами, усиливая их действие и позволяя уменьшить масштабы применения. После терапии IFN мясо и молоко можно использовать без ограничений, к тому же они не вызывают формирования резистентности у патогенов [1].

Единственным способом получения таких сложных молекул, как белки, например IFN, является использование трансгенных организмов-продуцентов, как правило бактерий, клеток млекопитающих и грибов. В настоящее время в продаже уже имеются препараты IFN, полученные с помощью бактерий [2]. Однако растения, как продуценты рекомбинантных белков, имеют ряд потенциальных преимуществ, среди которых можно выделить минимальную стоимость единицы биомассы. В случае съедобных растений появляется возможность избежать финансовых затрат на выделение и очистку целевого белка, что составляет в некоторых случаях до 80 % себестоимости рекомбинантного белка, а также не требуется специально обученный персонал для инъекционного введения [3].

Трансгенные растения табака (*Nicotiana tabacum* L.), продуцирующие бычий IFN-γ, были получены ранее в лаборатории генной и клеточной инженерии растений на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ. Было показано стабильное наследование трансгена в течение 4 поколений с сохранением экспрессии и присутствием в тканях растения IFN-γ быка, демонстрирующего биологическую активность (в опытах на культуре клеток быка и лабораторных мышах). Однако были выявлены и недостатки трансгенного табака: растение несъедобно, отличается малым и нестабильным уровнем накопления IFN-γ [3].

Для решения обнаруженных проблем в качестве объекта дальнейшей работы выбрали люцерну слабоусеченную (*Medicago truncatula* Gaertn.). Это растение съедобно и активно используется в сельском хозяйстве как кормовое. Для повышения уровня накопления целевого вещества использовали модифицированный (укороченный) ген куриного IFN-γ, который кодирует более устойчивый к протеолизу и при этом не теряющий своей активности белок [4].

С помощью агробактериальной трансформации были созданы пять независимых трансгенных растений, от которых самоопылением были получены потомки. Помимо стандартного анализа на наличие (ПЦР) и актив-

* Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства образования РФ на создание научного центра мирового класса «Агротехнологии будущего» (соглашение № 075-15-2022-322 от 22.04.2022).

© К. П. Чернов, М. С. Бурлаковский, Е. С. Окулова, Д. Р. Аглиуллина, М. В. Падкина, Л. А. Лутова, 2024

ность (ОТ-ПЦР, Вестерн-блот) трансгенной вставки была проведена «Прогулка по геному» (*Genome walking*) [5], позволившая установить наличие кластеров Т-ДНК (в 3 из 5 линий) и сайт встраивания в геном. Полученные результаты согласуются с литературными данными, гласящими, что оптимальной структурой для эффективной экспрессии трансгена является одиночная вставка Т-ДНК в активной регионе генома [3]. Также знание сайта встраивания позволяет при помощи ПЦР выявить гомозиготные особи, которые иначе можно обнаружить только по расщеплению в потомстве, что позволяет сократить сроки отбора чистых линий.

Образцы с лучшими показателями планируется испытать на живых курах и культуре куриных клеток.

Литература

1. Shabunin S. V., Vostroilova G. A., Grigoryeva N. A. et al. Interferons-α and -γ in clinical veterinary practice in the prevention and treatment of infectious diseases in cattle and pigs (review) // Agric. Sci. Euro-North-East. 2022. Vol. 23 (1). P. 16–35.

2. Castro L. S., Lobo G. S., Pereira P. et al. Interferon-Based Biopharmaceuticals: Overview on the Production, Purification, and Formulation // Vaccines. 2021. Vol. 9 (4). P. 328.

3. Burlakovskiy M., Saveleva N., Rumyantsev A. M. et al. The Structure of T-DNA Insertions in Transgenic Tobacco Plants Producing Bovine Interferon-Gamma // Appl. Sci. 2022. Vol. 12 (2). P. 761.

4. Цыганков М. А., Зобнина А. Е., Падкина М. В. Синтез модифицированных, устойчивых к протеолитической деградации интерферонов-гамма в дрожжах *Pichia pastoris* // Прикл. биохим. и микробиол. 2014. Т. 50 (4). С. 429–436.

5. Chang K., Wang Q., Shi X. et al. Stepwise partially overlapping primer-based PCR for genome walking // AMB Express. 2018. Vol. 8 (1). P. 77.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-117

МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ МАРКЕР ВОСПАЛЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ *PARASALMO MYKISS* *

MYELOPEROXIDASE AS A FUNCTIONAL MARKER OF INFLAMMATION ON THE EXAMPLE OF PARASALMO MYKISS

Н. А. Чечкова

Петрозаводский государственный университет

N. A. Chechkova

Petrozavodsk State University

✉ tche4kova.natalia@yandex.ru

Аннотация

В исследовании рассматривается физиологическая роль миелопероксидазы как показателя функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов. На примере четырех возрастных групп *Parasalmo mykiss* выявлено достоверное увеличение активности фермента с возрастом и в зависимости от условий окружающей среды. Результаты выполненного исследования необходимы для характеристики состояния неспецифических клеточных факторов защиты у объектов аквакультуры.

Abstract

The study examines the physiological role of myeloperoxidase as an indicator of the functional state of neutrophilic granulocytes. Using four age groups of *Parasalmo mykiss* as an example, a reliable increase in enzyme activity with age and depending on environmental conditions was revealed. The results of the study are necessary to characterize the state of non-specific cellular defense factors in aquaculture objects.

Миелопероксидаза (МПО) — это фермент, который играет важную роль в иммунной системе организма. Он участвует в процессе фагоцитоза, при котором клетки иммунной системы поглощают и уничтожают патогены. Повышенный уровень МПО может служить маркером риска развития воспалительных реакций и ранней диагностики патологического состояния организма, вызванного инфекциями. Высокопродуктивные линии *Parasalmo mykiss* обладают слабой резистентностью к возбудителям инфекций, что во многом зависит от особенностей их анатомо-физиологического барьера, иммунной системы, включая клеточные факторы врожденного иммунитета. Активность фагоцитирующих клеток врожденного иммунитета определяется их метаболическими свойствами, способностью элиминировать чужеродные антигены внутриклеточным или внеклеточным киллингом также за счет внеклеточных сетей (*neutrophil extracellular traps*, NET), облегчающих последующий фагоцитоз.

Целью данного исследования стало изучение функционального состояния фагоцитов *P. mykiss*. Акцент сделан на определении активности МПО как функциональном маркере воспаления для ранней диагностики и профилактики бактериозов объектов аквакультуры. Снижение метаболической активности фагоцитирующих клеток свидетельствует о длительной персистенции возбудителей и хронизации инфекционного процесса, повышение является объективным признаком острой фазы инфекционного заболевания.

Для исследования активности миелопероксидазы фагоцитов было отобрано 40 особей *P. mykiss* четырех возрастных групп (по 10 особей в каждой группе), выращенных при разных условиях окружающей среды. Кровь для анализа отбирали из хвостовой вены. Фракционирование клеток крови выполняли дифференциальным центрифугированием в градиенте плотности. Для этого пробу крови центрифугировали 30 мин при 1500 об/мин. Активность миелопероксидазы в фагоцитах оценивали спектрофотометрически. В качестве субстратной смеси использовали ортофенилендиамин, фосфатно-цитратный буфер, раствор перекиси водорода, суспензию опсонизированного зимозана и 10%-ю серную кислоту для остановки реакции. Все измерения выполняли на универсальном однолучевом спектрофотометре LEKI SS2107 в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью Analysis ToolPak в программном приложении Exel. Статистически достоверным уровнем значимости считали $p \leqslant 0{,}5$.

* Исследование выполнено на средства гранта Российского научного фонда № 322-23 (соглашение № 23-16-20026), проводимого совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

© Н. А. Чечкова, 2024

В результате определения активности миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках крови радужной форели спектрофотометическим методом установлено достоверное снижение активности фермента с увеличением возраста форели. У однолетних и двухлетних особей форели активность миелопероксидазы фагоцитов находилась в диапазоне от 1,09 ± 0,04 до 1,24 ± 0,08 опт. ед., в то время как у трехлетних и четырехлетних особей — в диапазоне от 0,43 ± 0,01 до 0,86 ± 0,01 опт. ед. Необходимо отметить, что содержание МПО в фагоцитах исследуемых особей радужной форели зависело от условий выращивания. Так, при повышении температуры и плотности посадки содержание МПО увеличивалось в среднем на 10–15 % независимо от возраста рыбы. Это может быть связано с тем, что при стрессе происходит активация синтеза МПО как одного из защитных механизмов. Полученные первичные данные свидетельствуют о необходимости использования функционального состояния фагоцитов (нейтрофильных гранулоцитов) высокопродуктивных линий объектов аквакультуры для характеристики состояния неспецифических клеточных факторов защиты, особенно при патологиях, соответствующих острым или хроническим воспалительным и (или) инфекционным заболеваниям различной этиологии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-118

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *APIS MELLIFERA* В ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ *IN VITRO*

PERFORMANCE OF *APIS MELLIFERA* USE IN *IN VITRO* PARASITOLOGICAL RESEARCH

Н. Д. Шамаев[1–3], Э. А. Шуралев[1,2,4], М. Н. Мукминов[1,2]

[1]*Казанский федеральный университет*
[2]*Казанская государственная медицинская академия*
[3]*Казанский государственный медицинский университет*
[4]*Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана*

N. D. Shamaev[1–3], E. A. Shuralev[1,2,4], M. N. Mukminov[1,2]

[1]*Kazan Federal University*
[2]*Kazan State Medical Academy*
[3]*Kazan State Medical University*
[4]*Bauman Kazan State Academy of Veterinary Medicine*

✉ nikolai.shamaev94@mail.ru

Аннотация

Европейские породы медоносных пчел *Apis mellifera* переживают спад из-за заболевания нозематозом, вызываемым микроспоридиями рода *Nosema*. Это заболевание трудно изучать из-за множества стрессоров и отсутствия надежных биоанализов. Методы инкубации *in vitro* позволяют установить состав рациона отдельных колоний, однако сообщалось о высоких показателях смертности. Это исследование было направлено на разработку улучшенного протокола инкубации *in vitro* для оценки угроз росту и выживанию медоносных пчел, вызванных микроспоридиями *Nosema*. Исследование улучшило такие параметры, как состав рациона, и обнаружило, что экстракт *Galleria mellonella* эффективен для общего выращивания медоносных пчел *in vitro*.

Abstract

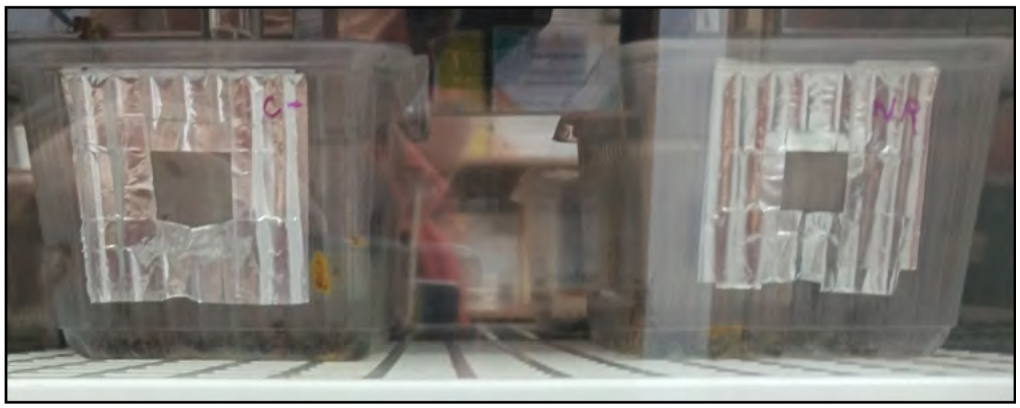
European honey bee breeds *Apis mellifera* are experiencing a decline due to the nosemosis disease caused by microsporidia of the genus *Nosema*. This disease is difficult to study due to multiple stressors and lack of reliable bioassays. In vitro incubation techniques can establish the diet composition of individual colonies, but high mortality rates have been reported. This study aimed to develop an improved *in vitro* incubation protocol to assess threats to honey bee growth and survival caused by *Nosema* microsporidia. The study improved parameters such as diet composition and found that *Galleria mellonella* extract was effective for general *in vitro* honey bee rearing.

Одной из основных причин сокращения популяций европейских медоносных пчел *Apis mellifera* (важного вида для опыления энтомофильных культур) является болезнь нозематоз, вызываемая микроспоридиями рода *Nosema* [1]. Сложность в изучении влияние патогенов обусловлена одновременным влиянием нескольких стрессоров, например среды инкубации и диеты, а также отсутствием надежных и повторяемых биоанализов [2]. Благодаря методам инкубации медоносных пчел *in vitro* можно установить состав диеты для каждой отдельной пчелосемьи, стандартизировать переменные окружающей среды, такие как температура и влажность, и в дальнейшем измерить уровень воздействия патогенов [3]. Однако в ряде опубликованных исследований отмечается очень высокая смертность медоносной пчелы, инкубируемой *in vitro* [4].

Цель работы — разработать усовершенствованный протокол инкубации медоносных пчел *in vitro* для оценки угроз для роста и выживания медоносных пчел, вызванных микроспоридиями рода *Nosema*. В работе были подготовлены сборные пчелосемьи подвида *A. m. carnica*, включающие в себя рабочих медоносных пчел, собранных из нескольких чистопородных семей. Для испытаний использовали модифицированную популяционную клетку из полиэтиленгликольтерефталата с поилкой и заполнением до 0,3 г рабочих медоносных пчел (см. рисунок). Перед испытаниями в лабораторных условиях было установлено отсутствие в пробах жизнеспособных спор микроспоридий рода *Nosema*, а также инсектицидов и отдельных наиболее опасных химических компонентов. На первом этапе были определены такие параметры, как среда инкубации и состав диеты. На втором этапе было проведено экспериментальное заражение спорами микроспоридий рода *Nosema*.

© Н. Д. Шамаев, Э. А. Шуралев, М. Н. Мукминов, 2024

В результате были усовершенствованы такие параметры, как состав диеты (40%-я смесь сахарозы/водного сиропа). Был изучен эффект кормовой добавки на основе экстракта *Galleria mellonella* для общей практики выращивания медоносных пчел *in vitro*, который показал высокую выживаемость медоносных пчел. Исследование смесей со спорами микроспоридий рода *Nosema* в лабораторных условиях по усовершенствованному протоколу подтвердило возможность дальнейшего использования при многократном сравнении с ранее задокументированными показателями влияния доз инокулятов, где разница между показателями была статистически незначительной.



Инкубация *Apis mellifera* (заполнение до 0,3 г рабочих медоносных пчел) в модифицированных популяционных клетках из полиэтиленгликольтерефталата с поилкой

Литература

1. Shamaev N. D., Shuralev E. A., Mukminov M. N. Current status of *Nosema* spp. infection cases in *Apis mellifera* in Eurasian countries and *Ptp3* gene haplotypes in the Republic of Tatarstan, Russia // Vet. Res. Commun. 2024. Vol. 48 (4). P. 2691–2698.

2. Gallai N., Salles J. M., Settele J., Vaissière B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted to pollinator decline // Ecol. Econ. 2009. Vol. 68. P. 810–821.

3. Staveley J. P., Law S. A., Fairbrother A., Menzie C. A. A causal analysis of observed declines in. managed honey bees (*Apis mellifera*) // HERA. 2014. Vol. 20. P. 566–591.

4. Zhu W., Schmehl D. R., Mullin C. A., Frazier J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae // PLoS ONE. 2014. Vol. 9. e77547.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-119

РАЗРАБОТКА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ХЛОРИНА Е6 С РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ *

DEVELOPMENT OF NEW GENERATION PHOTOSENSITIZERS BASED ON CHLORIN E6 WITH RARE EARTH ELEMENTS

О. В. Шевченко[1], И. Н. Черненко[1], Е. В. Елисеева[1], М. А. Медков[2], В. Б. Шуматов[1]

[1] *Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток*
[2] *Институт химии ДВО РАН, Владивосток*

O. V. Shevchenko[1], I. N. Chernenko[1], E. V. Eliseeva[1], M. A. Medkov[2], V. B. Shumatov[1]

[1] *Pacific State Medical University, Vladivostok*
[2] *Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok*

✉ shevchenko.ov@tgmu.ru

Аннотация

Методами направленного синтеза получен комплекс европия (III) с Хлорином е6 — широко применяемым фотосенсибилизатором в методе фотодинамической терапии. Соединение изучено методами инфракрасной, люминесцентной и фотоэлектронной спектроскопии. Люминесценция комплексов проявляется полосами эмиссии в широкой области спектра от 400 до 700 нм, характерной как для Eu^{3+} в комплексных соединениях, так и для Хлорина е6. Показано увеличение интенсивности люминесценции иона Eu^{3+} в красной области при комплексообразовании с Хлорином е6, что может быть использовано для направленного подведения светового излучения к Хлорину е6 и, как следствие, более эффективному образованию активных форм кислорода. Исследована темновая цитотоксичность синтезируемых субстанций в отсутствие воздействия света на модели *in vitro* на культуре клеток асцитной аденокарциномы Эрлиха в диапазоне концентраций от 12,5 до 400,0 мкг/мл. Показано, что для дальнейших исследований биологической эффективности безопасными являются концентрации препарата от 50 мкг/мл и ниже.

Abstract

Complex of europium (III) with Chlorin e6 (as a widely used photosensitizer in photodynamic therapy, was obtained using targeted synthesis methods. The compounds were studied using infrared, luminescent and photoelectron spectroscopy. The luminescence of the complexes is manifested by emission bands in a wide spectral region from 400 to 700 nm, characteristic of both Eu^{3+} in complex compounds and Chlorin e6. An increase in the luminescence intensity of the Eu^{3+} ion in the red region during complex formation with Chlorin e6 was shown. It can be used to target light radiation to Chlorin e6 and, as a consequence, more efficient formation of reactive oxygen species. Dark cytotoxicity of synthesized substances in the absence of exposure to light in an *«in vitro»* model using a cell culture of Ehrlich ascites adenocarcinoma in the concentration range from 12.5 to 400.0 μg/ml. It has been shown that drug concentrations of 50 μg/ml and lower are safe for further studies of biological effectiveness.

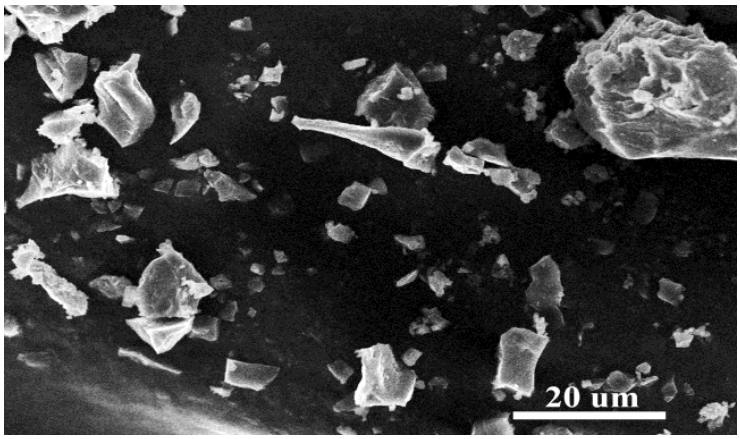
Эффективно работающий в методе фотодинамической терапии (ФДТ) фотосенсибилизатор должен обладать довольно большим набором свойств: интенсивно поглощать свет с длиной волны 680–800 нм в красной области спектра, селективно накапливаться в опухолевых тканях в достаточно высокой концентрации, показывать высокий выход синглетного кислорода, иметь низкую темновую токсичность, быть доступным, стабильным и растворимым в физиологических жидкостях и др. Несмотря на массив исследований в области ФДТ, истинный потенциал метода еще не достигнут [1]. Требуется продолжать исследования по получению, модификации и использованию фотосенсибилизатора в методе ФДТ. Для расширения возможностей метода ФДТ, а именно «самосветящейся ФДТ» (*self-lighting photodynamic therapy*), одну из ключевых ролей играют сведения о физико-химических свойствах и механизме взаимодействия фотосенсибилизатора и вводимых в раствор люминесцирующих молекулярных агентов.

На рисунке приведена микрофотография образца синтезированного комплексного соединения европия с Хлорином е6.

Энергодисперсионный спектр показывает наличие в составе комплексного соединения европия с Хлорином е6 четырех элементов: углерода, кислорода, азота и европия. Количество элементов в составе выделенного

* Исследование выполнено при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030».
© О. В. Шевченко, И. Н. Черненко, Е. В. Елисеева, М. А. Медков, В. Б. Шуматов, 2024

комплексного соединения составляет: C — 54,66 вес. % или 75,56 ат. %; O — 12,85 вес. % или 13,33 ат. %; N — 7,51 вес. % или 8,89 ат. %; Eu — 20,35 вес. % или 2,22 ат. %.



Микрофотография образца комплексного соединения европия (III) с Хлорином е6

По данным исследований темновой цитотоксичности на опухолевых клетках асцитной аденокарциномы Эрлиха количество жизнеспособных клеток после суточного контакта с комплексным соединением в концентрации 12,5 мкг/мл составило 94,97 ± 4,75 %, в то время как для отрицательного контроля — 98,22 ± 1,47 %, для положительного — 7,50 ± 0,38 %.

Методом проточной цитометрии после окрашивания интеркалирующим зондом 7-Аминоактиномицином Д показано более селективное накопление разрабатываемого вещества в опухолевых клетках (94,43 ± 4,82 %), нежели в клетках фибробластов легкого (17,22 ± 0,86 %).

На основании кратко представленных результатов исследования можно заключить о перспективности синтезированного впервые комплексного соединения Хлорина е6 с европием в качестве потенциального фотосенсибилизатора.

Литература

1. Li X., Lee S., Yoon J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy // Chem. Soc. Rev. 2018. Vol. 47, No. 4. P. 1174–1188.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-120

ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ВИСМУТА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ ИЗ СВИНЦА ВИСМУТИСТОГО

PRODUCTION OF BISMUTH COMPOUNDS FOR MEDICINE FROM LEAD BISMUTHITE

О. Д. Шеина[1], А. С. Даминов[2], Ю. М. Юхин[1]

[1]*Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск*
[2]*ООО «Завод редких металлов», р.п. Кольцово*

O. D. Sheina[1], A. S. Daminov[2], Yu. M. Yukhin[1]

[1]*Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Rare Metals Plant, LLC, Koltsovo*

✉ lesschein@yandex.ru

Аннотация

Исследована возможность получения соединений висмута для медицины из свинца висмутистого, получаемого в процессе переработки свинцовых, медных, оловянных и вольфрам-молибденовых концентратов путем его растворения в азотной кислоте, очистки висмута осаждением в виде основного нитрата состава $[Bi_6O_5(OH)_3](NO_3)_5 \cdot 3H_2O$ и получением соединений высокой чистоты путем его взаимодействия с растворами минеральных или органических кислот.

Abstract

The possibility of obtaining bismuth compounds for medicine from bismuth lead obtained during the processing of lead, copper, tin and tungsten-molybdenum concentrates by dissolving it in nitric acid, purification of bismuth by precipitation in the form of basic nitrate $[Bi_6O_5(OH)_3](NO_3)_5 \cdot 3H_2O$ and obtaining compounds of high purity by its interaction with solutions of mineral or organic acids was investigated.

В настоящее время в России и за рубежом широкое применение в медицине находят соединения висмута высокой чистоты и терапевтической активности. Так, при лечении желудочно-кишечных заболеваний используют висмут нитрат основной, салицилат и висмут трикалия дицитрат (препараты Викалин, Викаир, Де-нол, Де-смол). Основные галлат (Дерматол) и трибромфенолят (Ксероформ) используются в виде присыпок, мазей, паст при лечении кожных заболеваний, а висмут виннокислый (Бисмоверол) в виде масляной взвеси применяется при лечении люэса [1, 2].

При получении соединений в качестве исходного сырья используют металл марки Ви1, содержащий не менее 98 % висмута. Этот металл получают в процессе пирометаллургической переработки свинцовых, медных, оловянных и вольфрам-молибденовых концентратов. При переработке концентратов получают свинец висмутистый, содержащий 6–40 % висмута, и в результате сложной его переработки электролизом с последующим рафинированием получают металл марки Ви1. Целесообразно получать соединения висмута для медицины из свинца висмутистого по гидрометаллургической схеме, минуя стадию получения металлического висмута.

Проведенные исследования свидетельствуют, что переработку свинца висмутистого целесообразно проводить путем растворения сплава в азотной кислоте с концентрацией 4,2 моль/л, содержащей 5,0 вес. % карбамида (для устранения выделения в газовую фазу оксидов азота) при температуре 70–90 °С. В результате добавления к полученному раствору при перемешивании карбоната аммония до установления pH раствора 2,0–3,0 висмут осаждают из раствора в виде основного нитрата технической чистоты. Висмутсодержащий осадок, представляющий собой основной нитрат состава $[Bi_6O_4(OH)_4](NO_3)_6 \cdot H_2O$, обрабатывают при перемешивании и температуре 60–70 °С раствором азотной кислоты с концентрацией 6,0 моль/л, полученный раствор разбавляют в два раза дистиллированной водой и осаждают висмут при перемешивании и температуре 55 °С добавлением раствора карбоната аммония до pH раствора 0,9. Осадок промывают однократно раствором азотной кислоты с концентрацией 0,1 моль/л, двукратно дистиллированной водой при температуре 50–60 °С и сушат основной нитрат состава $[Bi_6O_5(OH)_3](NO_3)_5 \cdot 3H_2O$ при температуре 90–100 °С. Полученный основной нитрат висмута соответствует требованиям ФС.2.2.0052.

© О. Д. Шеина, А. С. Даминов, Ю. М. Юхин, 2024

Показана целесообразность получения соединений висмута высокой чистоты путем взаимодействия оксогидроксонитрата висмута состава $[Bi_6O_5(OH)_3](NO_3)_5 \cdot 3H_2O$ с растворами минеральных (азотной, серной, соляной), а также органических (винной, щавелевой, лимонной, галловой, салициловой) кислот. Последнее позволяет существенно сократить технологический цикл за счет устранения стадий предварительного получения оксида висмута прокаливанием основного нитрата и растворения полученного оксида в соответствующих кислотах, а также расширить спектр получаемых соединений висмута высокой чистоты для медицины с содержанием примесных металлов 1×10^{-4}–1×10^{-7} %.

Литература

1. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Новая волна, 2019. 1216 с.
2. Юхин Ю. М., Коледова Е. С., Логутенко О. А. Висмут и его соединения в медицине. М.: РАН, 2022. 234 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-121

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БАЙКАЛЬСКОГО ОКСИФИЛЬНОГО ШТАММА *JANTHINOBACTERIUM* SP. НА МУЖСКИЕ ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ [*]

ASSESSMENT OF THE IMPACT OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT NATURAL COMPOUNDS FROM THE BAIKAL OXIPHILIC STRAIN *JANTHINOBACTERIUM* SP. ON MALE GAMETES

В. Н. Шелковникова, М. Е. Дмитриева, А. А. Баталова,
А. Ю. Белышенко, А. С. Листопад, Д. В. Аксенов-Грибанов

Иркутский государственный университет

V. N. Shelkovnikova, M. E. Dmitrieva, A. A. Batalova,
A. Yu. Belyshenko, A. S. Listopad, D. V. Axenov-Gribanov

Irkutsk State University

✉ shelkovnikova551@gmail.com

Аннотация

В эксперименте оценивалось влияние экстракта байкальского оксифильного штамма *Janthinobacterium* sp. на сперматозоиды человека. Выявлено, что разбавленный экстракт и некоторые протестированные фракции оказывали стимулирующее действие на сперматозоиды, что может быть полезно при разработке препаратов для повышения их активности.

Abstract

The experiment assessed the impact of an extract from the Baikal oxiphilic strain Janthinobacterium sp. on human spermatozoa. It was found that the diluted extract and some tested fractions had a stimulating effect on the spermatozoa, which could be useful in the development of drugs to enhance their activity.

Бесплодие является одной из главных проблем современного здравоохранения. Подсчитано, что на мужской фактор приходится около 50 % всех зарегистрированных случаев бесплодия во всем мире. Окислительный стресс является одной из основных причин репродуктивной дисфункции. Повышение уровня активных форм кислорода непосредственно повреждает ДНК сперматозоидов, что приводит к бесплодию. Согласно указу о национальных целях развития Российской Федерации от 7 мая 2024 г., к 2030 г. необходимо достижение суммарного коэффициента рождаемости на уровне 1,6, а к 2036 г. — 1,8. Учитывая задачи, поставленные президентом В. Путиным по увеличению рождаемости и поддержке семьи, вопросы лечения бесплодия приобретают особую актуальность. Однако эффективность медикаментозной терапии представляется достаточно низкой ввиду сверхмалого количества лекарственных препаратов в России, прямо направленных на восстановление репродуктивного потенциала.

Актуальной задачей выступает поиск новых биологически активных природных соединений — прототипов будущих лекарственных препаратов.

Рядом исследований показано, что микроорганизмы озера Байкал обладают бесспорным преимуществом по числу ранее неизученных природных соединений. Согласно литературным данным, в Байкале наблюдается круглогодичное содержание кислорода в воде в концентрации 12–14 мг/л, а во время подледного цветения водорослей отмечаются локальные повышения концентрации кислорода до 18 мг/л. В связи с этим нами была сформирована гипотеза, что в условиях высокого содержания растворенного кислорода в озере Байкал обитают свободноживущие оксифильные микроорганизмы, которые могут синтезировать антиоксиданты для защиты от окислительного стресса.

Таким образом, экосистема озера Байкал предоставляет уникальные возможности по трансляции антиоксидантного потенциала микроорганизмов для репродуктивной медицины.

Целью данного исследования являлся оценка воздействия экстрактов байкальского оксифильного штамма *Janthinobacterium* sp. 2021M8 на функциональные показатели сперматозоидов человека *in vitro*. Анализ проводили с использованием микроскопа PLS-MY-B041A-3, программного обеспечения Semen and sperm

[*] Исследование выполнено при поддержке проекта Минобрнауки России (FZZE-2024-0003).

© В. Н. Шелковникова, М. Е. Дмитриева, А. А. Баталова, А. Ю. Белышенко, А. С. Листопад, Д. В. Аксенов-Грибанов, 2024

quality analyze system (V1.12) и 96-луночного планшета с оптически прозрачным дном. Для контрольных условий в планшет наносили метанол и высушивали до полного испарения. К испарившемуся метанолу добавляли эякулят. Экспериментальные образцы были разделены на 2 группы. Для 1-й группы использовали концентрированный метанольный экстракт. Для 2-й группы концентрированный экстракт был разбавлен метанолом в 10 раз. Также был проведен анализ влияния фракций экстракта штамма *Janthinobacterium* sp. 2021M8. Фракционирование проводили на хроматографической колонке, заполненной сефадексом LH-20. Измерение физиологических параметров сперматозоидов проводили после 1; 3 и 6 ч инкубации при 37 °C по протоколам руководства ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека (5-е изд.). Анализ проводили в 3 аналитических повторностях.

Согласно полученным результатам, концентрированный экстракт штамма вызывал гибель сперматозоидов после 3 ч экспозиции. Однако сперматозоиды сохраняли свою жизнеспособность спустя 6 ч экспозиции при воздействии разбавленного экстракта. При этом в контрольных условиях спустя 6 ч эксперимента наблюдали гибель сперматозоидов. Фракционирование экстракта штамма *Janthinobacterium* 2021M8 выявило, что не менее половины полученных фракций обладают спермицидным эффектом. В то же время некоторые протестированные фракции обладали эффектом, способствующим повышению числа подвижных форм и скорости сперматозоидов.

Таким образом, полученные материалы могут способствовать разработке биотехнологических продуктов, которые могут выступить прототипом лекарственных препаратов, направленных на повышение активности сперматозоидов и увеличение продолжительности их жизни.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-122

ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЭРЕМОМИЦИНА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ ТЕМПЕРАТУРЫ И РН

INVESTIGATION OF THE STABILITY OF EREMOMYCIN IN CULTURE FLUID AT VARIOUS TEMPERATURE AND PH CONDITIONS

А. С. Шибаева[1], Е. В. Глаголева[1], Т. М. Воинова[2], В. В. Джавахия[1]

[1]*Российский биотехнологический университет, Москва*
[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Москва*

A. S. Shibaeva[1], E. V. Glagoleva[1], T. M. Voinova[2], V. V. Djavakhia[1]

[1]*Russian Biotechnological University, Moscow*
[2]*All-Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow*

✉ aleksandrashibaeva@mail.ru

Аннотация

В работе была исследована стабильность антибиотика эремомицина в культуральной жидкости штамма *Amycolotopsis oryentalis* при хранении в условиях комнатной и пониженной температур, а также в комбинации с разными значениями pH. Сделан вывод об оптимальных условиях хранения культуральной жидкости для сохранности эремомицина.

Abstract

The stability of eremomycin in the culture fluid of the strain *Amycolatopsis orientalis* was investigated during storage under ambient and low temperatures as well as under various pH conditions. The findings provide insights into the ideal storage parameters for maintaining integrity of eremomycin within the culture fluid.

Эремомицин — гликопептидный антибиотик, выделенный в ГУ НИИНА им. Г. Ф. Гаузе РАМН [1]. Его продуцентом является актиномицент *Amycolatopsis orientalis*. Эремомицин может стать кандидатом для использования в сельскохозяйственном животноводстве, так как никогда не применялся в медицинской практике, что является достоинством в условиях развития резистентности возбудителей ко многим антибиотикам. Также эремомицин обладает более высокой активностью при более низкой токсичности относительно некоторых антибиотиков его группы [1, 2].

Для промышленного биотехнологического производства подобного препарата необходимо изучить ряд технологических параметров, среди которых стабильность вещества в культуральной жидкости (КЖ) при хранении.

Цель работы — исследовать стабильность эремомицина в КЖ при различных условиях хранения в течение 7 суток.

Материалы и методы

Для работы использовали штамм *Amycolatopsis orientalis* Е 4-7, полученный методом УФ-мутагенеза из коллекционного штамма ВКПМ Ас-1125. КЖ получали в колбах объемом 0,05 л культивированием *A. orientalis* в жидкой среде в течение 8 суток. Для исследования брали по три колбы для каждого варианта условий. Длительность эксперимента составила 7 суток. Отбор проб для анализа проводили ежедневно в одно и то же время.

Количественный анализ содержания в пробах эремомицина производился методом ВЭЖХ-УФ. КЖ экстрагировали 0,25 М аммоний-фосфатным буфером в соотношении 1 : 3. Условия ВЭЖХ анализа: С18 (200 мм × × 4,6 мм, 5 μм), 30 : 70 метанол, буфер 0,25 М $(NH_4)_2HPO_4$ pH 8, длина волны 280 нм, температура 50 °С, изократический режим элюирования. Стандартный образец эремомицина был получен в ГУ НИИНА. Чистота образца составляла не менее 97 %.

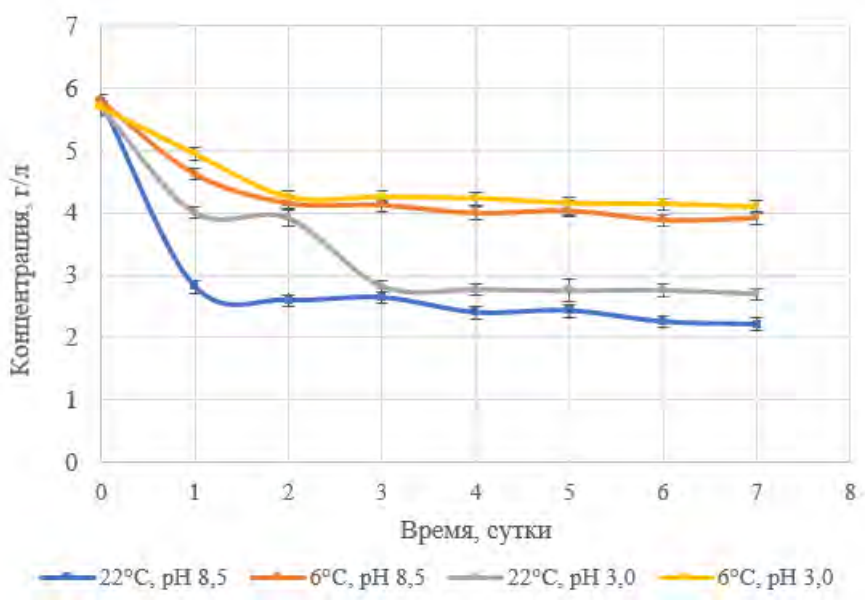
Результаты

Для исследования стабильности эремомицина изучали динамику деградации вещества в течение 7 суток в условиях комнатной (+22 °С) и пониженной (+6 °С) температур, а также в условиях конечного pH роста культуры (около 8,5) и сниженного pH КЖ до значения 3,0.

© А. С. Шибаева, Е. В. Глаголева, Т. М. Воинова, В. В. Джавахия, 2024

Итоговая зависимость изображена на рисунке.

Исходная концентрация эремомицина в КЖ составляла 5,74 ± 055 г/л. При комнатной температуре и pH 8,5 КЖ уже на вторые сутки наблюдалось падение концентрации эремомомицина примерно на 50 %, а на 7-е сутки — более чем на 60 %. При снижении pH до 3,0 деградация на 2-е сутки достигала уже 30 %, тем не менее дальнейшая сохранность находилась на уровне 50 % от исходной концентрации.



Стабильность эремомицина при различных условиях в течение 7 суток

При пониженной до +6 °С температуре в первые и вторые сутки снижение концентрации составляло 20,1 и 13,0 % для конечного (8,5) и пониженного pH (3,0) соответственно. Дальнейшее снижение концентрации эремомицина при хранении не превышало 33,5 %.

Выводы

Наибольшая сохранность эремомицина достигается при КЖ до +6 °С. При этом понижение pH незначительно повышает показатели сохранности в первые 2 суток (падение концентрации не более 20 %). Использование полученных данных позволит грамотно спланировать технологический процесс получения продукта высокого качества.

Литература

1. Gause G. F., Brazhnikova M. G., Lomakina N. N. et al. Eremomycin — new glycopeptide antibiotic: chemical properties and structure // J. Antibiot. 1989. Vol. 42 (12). P. 1750–759.

2. Filippos'iants S.T., Malkova I. V., Gol'dberg L. E. Glycopeptide antibiotics: Eremomycin, vancomycin, and teicoplanin. Comparison of several parameters of pharmacokinetics and antimicrobial activity // Antibiot. Khimioter. 1989. Vol. 34. P. 523–526.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-123

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НА «ЩЕТОЧНЫХ» БИОЧИПАХ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР*

DEVELOPMENT OF TECHNOLOGY FOR THE ANALYSIS OF BACTERIAL PATHOGENS ON "BRUSH" BIOCHIPS BY SOLID-PHASE MULTIPLEX PCR

И. Ю. Шишкин, К. А. Синников, П. А. Чиркова, С. А. Лапа, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

I. Yu. Shishkin, K. A. Sinnikov, P. A. Chirkova, S. A. Lapa, A. V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ shishkin.iv2017@yandex.ru

Аннотация

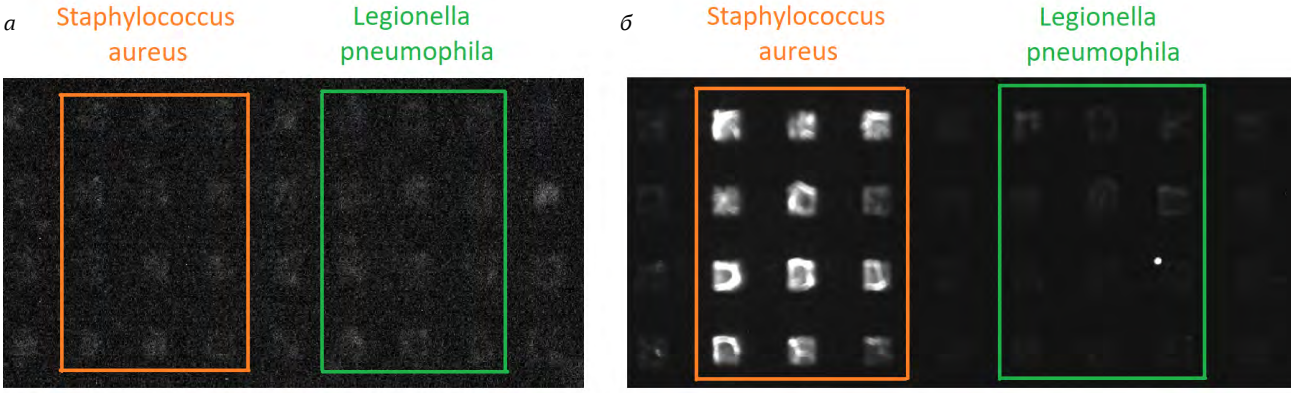
Методом фотолитографии на полимерных подложках получена матрица гидрогелевых ячеек, содержащих полимерные «щетки» с активными группами. Проведена ковалентная иммобилизация обратных праймеров, специфичных к *Staphylococcus aureus* или *Legionella pneumophila*, в соответствующие ячейки с последующей амплификацией в герметичной камере собранных биочипов.

Abstract

A matrix of hydrogel cells containing polymer "brushes" with active groups was obtained by photolithography on polymer substrates. Covalent immobilization of reverse primers specific to Staphylococcus aureus or Legionella pneumophila into the corresponding cells was performed, followed by amplification in a sealed chamber of the assembled biochips.

В технологии ДНК-биочипов используют коммерчески доступные материалы с низкой автофлуоресценцией, поэтому в качестве материала для подложки был выбран полиэтилентерефталат (ПЭТ). Проведение ПЦР на биочипах позволяет получать результаты параллельного анализа сразу на множество маркеров, что представляет значительный интерес в развитии медицинской диагностики.

Поверхность ПЭТ покрывали слоем фотоактивного полимера поливинилацетата (ПВАц) с фотоинициатором на центрифуге методом сбрасывания избытка раствора (*spin-coating*). Подбор концентрации фотоактивного полимера и фотоинициатора проводился экспериментально. Для получения матрицы ячеек на поверхности биочипов использовали метод фотолитографии. Для этого подложки помещали в специальный кондуктор, приливали раствор мономеров и облучали УФ-светом при длине волны 254 нм через кварцевую фотомаску с металлическим напылением. Размер одной ячейки 200 × 200 мкм, расстояние между ячейками 600 мкм. В качестве фотоиници-



Снимки с флуоресцентного микроскопа «щеточного» биочипа после проведения ПЦР на матрице *Staphylococcus aureus*: *а* — до проведения ПЦР; *б* — после проведения ПЦР и отмывки

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 20-14-00287-П).

© И. Ю. Шишкин, К. А. Синников, П. А. Чиркова, С. А. Лапа, А. В. Чудинов, 2024

атора был выбран бензофенон из-за его эффективной способности при облучении в его диапазоне поглощения отрывать протоны от поверхности фотоактивного полимера с образованием радикалов, необходимых для роста полимерных «щеток». В качестве мономеров использовали акриловую кислоту и акриламид. Подбор концентрации и соотношения мономеров проводился экспериментально. Активацию карбоксильных групп полимерных «щеток» проводили N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом с добавлением N-гидроксисукцинимида в буфере MES (pH = 5,4). Поверхность дополнительно блокировали от неспецифической сорбции компонентов ПЦР фосфатно-солевым буферным раствором PBS с pH = 7,2, содержащим Твин 20. Праймеры, специфичные к *Staphylococcus aureus* или *Legionella pneumophila*, были нанесены в соответствующие ячейки пином робота-манипулятора. После иммобилизации отмывку от непрореагировавших праймеров проводили в растворе триэтиламмонийгидрокарбоната в MQ/ацетонитрил (1 : 1). Непрореагировавшие сукцинимидные эфиры на полимерных «щетках» блокировали раствором лизина в PBS (pH = 7,4). Таким образом, были получены «щеточные» биочипы с ковалентно иммобилизованными праймерами.

ПЦР проводили в герметичной камере собранных биочипов в специальном термоциклере. В качестве матрицы использовали геномную ДНК *Staphylococcus aureus* 10^6 копий. В раствор помимо основных компонентов ПЦР добавляли набор прямых и обратных фланкирующих праймеров к обоим возбудителям в строгом соотношении, а также флуоресцентно-меченный дезоксиуридинтрифосфат, необходимый для последующей регистрации. После амплификации чипы отмывали 1X Taq ПЦР-буфером при температуре 95 °C и проводили регистрацию сигналов на флуоресцентном микроскопе (см. рисунок). Среднее соотношение сигнала к фону от целевых ячеек чипов, в которые были иммобилизованы праймеры к *Staphylococcus aureus*, к фону составляло 7 : 1, что является допустимым. Соотношение сигналов от нецелевых ячеек соизмеримо с фоновым. Из результатов видно, что ПЦР на «щеточных» биочипах проходит специфично и не наблюдается сильной сорбции меченого трифосфата и продуктов ПЦР в растворе на их поверхности.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-124

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМИНОСОДЕРЖАЩИХ КАТАЛИЗАТОРОВ РАСКРЫТИЯ ОКСИРАНОВОГО ЦИКЛА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ «ПОЛИМЕРНЫХ ЩЕТОК» ИЗ ГЛИЦИДИЛМЕТАКРИЛАТА В ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ БИОЧИПОВ *

THE USE OF AMINO-CONTAINING CATALYST FOR OPENING THE OXIRANE RING IN "POLYMER BRUSHES" MADE FROM GLYCIDYL METHACRYLATE IN PROTEIN BIOCHIP TECHNOLOGY

Г. Ф. Штылев, Д. А. Качуляк, О. А. Заседателева, А. В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

G. F. Shtylev, D. A. Kachulyak, O. A. Zasedateleva, A. V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ gosha100799@mail.ru

Аннотация

По иммобилизации флуоресцентного красителя осуществлен подбор катализаторов на основе аминов для раскрытия оксиранового цикла в полимерных щетках из глицидилметакрилата, прикрепленных к поверхности полибутилентерефталата. Выполнена иммобилизация белка, маркированного флуоресцентным красителем Cy3, для проверки полимерных щеток на реальной модели для применения чипа в иммунохимическом анализе антител.

Abstract

According to the immobilization of the fluorescent dye, amine-based catalysts were selected to open the oxirane cycle in polymer brushes made of glycidyl methacrylate attached to the surface of polybutylene terephthalate. Immobilization of a protein labeled with fluorescent dye Cy3 was performed to test polymer brushes on a real model for the use of the chip in immunochemical analysis of antibodies.

Разработка и применение биологических микрочипов стали важным достижением в современной биологии, биотехнологии и медицине. Одним из ключевых преимуществ микрочипов является возможность проводить многопараметрический параллельный анализ. Применение «полимерных щеток» является перспективным способом модификации поверхности для анализа молекулярных зондов. Многообещающими являются «полимерные щетки» с активными функциональными группами, например эпоксидными. Так, мономер глицидилметакрилат в составе полимерных щеток имеет оксирановый цикл, раскрытие которого происходит после реакции с нуклеофильными реагентами. Иммобилизация белков, содержащих амино- и тиогруппы, может проходить без дополнительной стадии активации, что сокращает стоимость и время анализа. Однако надо принимать во внимание, что нуклеофильность аминогрупп, которых в белках обычно значительно больше, чем тиогрупп, недостаточная и раскрытие эпоксидного цикла без катализатора занимает длительное время. Поэтому оптимизация условий иммобилизации белковых зондов на полимерные щетки с оксирановыми группами является актуальной задачей.

Подложку из полибутилентерефталата покрыли фотоактивным полимером, в состав которого входили поливинилацетат и бензофенон. На этой стадии применялся метод центрифугирования. С помощью фотолитографии получили полимерные щетки, состоящие из мономеров глицидилметакрилата, гидроксиэтилметакрилата и 2-(метакрилоилокси)этил]диметил-(3-сульфопропил) аммония. В качестве катализаторов для раскрытия эпоксидного цикла использовали триэтиламин (TEA), диизопропилэтиламин (DIPEA) и диметиламинопиридин (DMAP). Результаты иммобилизации флуоресцентного красителя с гексаметилендиаминовым линкером при использовании различных катализаторов на основе аминов приведены в таблице.

Применение триэтиламина в качестве катализатора показало наилучшую эффективность при иммобилизации флуоресцентного красителя. Однако известно, что триэтиламин обладает также хаотропными свойствами, которые могут пагубно сказаться на конформационной структуре белков. В щеточные ячейки биочипа иммобилизовали стрептавидин, маркированный Cy3. Соотношение сигнал/фон на канале Cy3 составило 34. Затем использовали проявляющие биотинилированные козьи антитела, меченые Cy5. Соотношение сигнал/фон на канале Cy5 составило 44.

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 20-14-00287-П).

© Г. Ф. Штылев, Д. А. Качуляк, О. А. Заседателева, А. В. Чудинов, 2024

Оценка эффективности аминов в качестве катализаторов для раскрытия эпоксидного цикла при помощи иммобилизации флуоресцентного красителя Cy5

	TEA	DIPEA	DMAP
$I_{сигнала}$	30000	6900	2000
$I_{фона}$	140	400	50
$I_{сигнала}/I_{фона}$	214	17	40

Таким образом, использование триэтиламина как катализатора для нуклеофильного раскрытия эпоксидного цикла не влияет на конформационную структуру белков и позволяет сократить время проведения иммунохимического анализа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-125

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ГАЛОФИЛЬНОГО ШТАММА *VREELANDELLA TITANICAE* 3SOL ИЗ ГИПЕРГАЛИННОГО ОЗЕРА ДУНИНО (Г. СОЛЬ-ИЛЕЦК, ОРЕНБУРГСКАЯ ОБЛАСТЬ)

CHARACTERISTICS OF THE NEW HALOPHILIC STRAIN *VREELANDELLA TITANICAE* 3SOL FROM HYPERHALINE LAKE DUNINO (SOL-ILETSK, ORENBURG REGION)

М. Н. Шустова[1,2], Е. Н. Капаруллина[1], Н. В. Доронина[1]

[1] *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Пущино*
[2] *Пущинский филиал Российского биотехнологического университета (РОСБИОТЕХ)*

M. N. Shustova[1,2], E. N. Kaparullina[1], N. V. Doronina[1]

[1] *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino*
[2] *Pushchino Branch of Russian Biotechnological University (BIOTECH University)*

✉ shustova.mn0709@gmail.com

Аннотация

Из гипергалинного озера Дунино (г. Соль-Илецк, Оренбургская область) выделен и детально охарактеризован новый галофильный штамм *Vreelandella titanicae* 3Sol.

Abstract

A novel halophilic strain *Vreelandella titanicae* 3Sol from the hyperhaline Lake Dunino (Sol-Iletsk, Orenburg region) was isolated and characterized in detail.

Гипергалинные озера повсеместно распространены на нашей планете, среди которых можно выделить группу Соль-Илецких соленых озер, располагающихся в Оренбургской области. Соль-Илецкое озеро Дунино имеет карстово-антропогенное происхождение и высокую соленостью рапы (около 300 г/л NaCl) [1]. Структура этих озер и биоразнообразие их обитателей являются уникальными. Поиск, выделение и изучение галофильных микроорганизмов гипергалинных озер представляют особый интерес для исследователей.

Цель данной работы — выделение и характеристика нового галофильного штамма из озера Дунино.

Из образца воды, отобранного из оз. Дунино (г. Соль-Илецк) на богатой агаризованной среде LB с 3 % NaCl выделен гетеротрофный штамм 3Sol. На основании секвенирования гена 16S рРНК штамм имел 99,7 % сходства с *Vreelandella titanicae* BH1^T (ранее *Halomonas titanicae* BH1^T) [2, 3]. Этот уровень сходства выше порогового значения (98,65 %), рекомендованного для разделения видов [4], и штамм 3Sol отнесен нами к данному виду. Показано, что новый изолят представлен грамотрицательными неподвижными палочками, колонии на среде LB с 3 % NaCl, круглые, желтоватые, с ровным краем, с выпуклым профилем, гладкой поверхностью и однородной структурой. Аэроб, оксидазо- и каталазоположителен. Растет при 16–37 °С (оптимально 29 °С) и pH 5,5–10,0 (7,0–7,5), в присутствии 0,25–27,0 % NaCl (оптимально 3,0–8,0 % NaCl). Гетеротроф, использует различные полиуглеродные соединения в качестве источников углерода и энергии. В качестве источников азота использует соли аммония, нитраты и аминокислоты. Штамм деградадирует бензоат натрия, декан, гексадекан, нефть и дизельное топливо. Установлено, что исследуемый штамм активно растет в ассоциации с метилотрофными представителями рода *Methylophaga* на минеральной среде с метанолом как единственном источнике углерода и энергии.

При культивировании на минеральной среде К1 [5] с добавлением L-триптофана в качестве предшественника синтеза фитогормонов ауксинов с 5 % NaCl на различных источниках углерода, таких как глицерин/сорбит/глюкоза, штамм *V. titanicae* 3Sol синтезирует индолпроизводные в концентрации 6,0/35,0/40,0 ± 0,5 мкг/мл соответственно.

Кроме того, выявлена способность штамма *V. titanicae* 3Sol растворять неорганические фосфаты на агаризованной и жидкой минеральных средах с добавлением нерастворимого $Ca_3(PO_4)_2$ в качестве единственного источника фосфора. Концентрация растворенного фосфора достигала 20,0 ± 10,0 мкг/мл культуральной жидкости, что указывает на наличие солюбилизирующей активности и способности к улучшению фосфорного питания растений.

© М. Н. Шустова, Е. Н. Капаруллина, Н. В. Доронина, 2024

Обнаружено также, что исследуемый штамм способен к синтезу сидерофоров, поскольку при культивировании штамма на CAS-агаре выявлена зона изменения цвета индикатора. Известно, что сидерофоры способны хелатировать ионы железа и ограничивать рост фитопатогенов. Нами отмечено, что *V. titanicae* 3Sol проявлял антагонистическую активность по отношению к грамотрицательным бактериям *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas veronii* и грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*.

Большой научно-практический интерес представляет синтез биодеградабельных и биосовместимых пластиков из дешевого непищевого сырья и отходов агрокомплексов и различных производств. Показано, что при культивировании на среде с глюкозой исследуемый штамм синтезировал 20,0 ± 0,7 % поли-3-гидроксибутирата (ПГБ) от веса сухих клеток. Тогда как содержание ПГБ при выращивании на непищевом субстрате глицерине составил 16,0 ± 0,5 % от массы сухих клеток, что вполне соизмеримо с выходом при культивировании на дорогостоящем пищевом субстрате глюкозе.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности штамма *V. titanicae* 3Sol в качестве деструктора углеводородов, стимулятора роста растений в экосистемах с высокой соленостью за счет синтеза фитогормонов ауксинов, сидерофоров и растворения неорганических фосфатов, а также как продуцента биодеградабельного пластика ПГБ.

Литература

1. Selivanova E.A., Poshvina D.V., Khlopko Y.A. et al. // Microbiology. 2018. Vol. 87. P. 569–582.

2. Sánchez-Porro C., Kaur B., Mann H., Ventosa A. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. Vol. 60 (12). P. 2768–2774.

3. de la Haba R.R., Arahal D.R., Sanches-Porro C., Chuvochina M., Wittouck S., Hugenholtz P., Ventosa A. // Front. Microbiol. 2023. Vol. 14. P. 1293707.

4. Chun J., Oren A., Ventosa A. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. Vol. 68 (1). P. 461–466.

5. Agafonova N.V., Belova A.A., Kaparullina E.N. et al. () // Antonie van Leeuwenhoek. 2023. Vol. 116. P. 855–866.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-126

АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОДИСПЕРСИЙ С ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ *

ANTIOXIDANT AND ANTIPLATELET PROPERTIES OF NANODISPERSIONS WITH LIPOIC ACID

В. А. Щелконогов[1–3], О. А. Козлова[1], А. М. Иншакова[1], Е. С. Дарнотук[1], А. В. Шипелова[1], Н. С. Шастина[1], О. А. Баранова[2,3], А. В. Чеканов[2,3], К. Д. Казаринов[3], Э. Ю. Соловьева[2], А. И. Федин[2]

[1]МИРЭА — Российский технологический университет, Москва
[2]Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва
[3]Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Фрязино

V. A. Shchelkonogov[1–3], O. A. Kozlova[1], A. M. Inshakova[1], E. S. Darnotuk[1], A. V. Shipelova[1], N. S. Shastina[1], O. A. Baranova[2,3], A. V. Chekanov[2,3], K. D. Kazarinov[3], E. Yu. Solov'eva[2], A. I. Fedin[2]

[1]MIREA — Russian Technological University, Moscow,
[2]Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
[3]Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics RAS, Fryazino

✉ vasiliy9999@yandex.ru

Аннотация

Получены нанодисперсии с липоевой кислотой (ЛК) с размером частиц от 25 до 350 нм, характеризующиеся ее медленным высвобождением из наночастиц (НЧ) и высокой стабильностью при длительном хранении при комнатной температуре. В наноэмульсиях удалось повысить солюбилизацию ЛК в 1,5 раза по сравнению с липосомами. Показано, что НЧ с ЛК обладают выраженными антиоксидантными и антиагрегационными свойствами.

Abstract

Nanodispersions (NDs) with lipoic acid (LA) with a particle size 25–350 nm were obtained, characterized by its slow release from nanoparticles and high stability during long-term storage at room temperature. In nanoemulsions, it was possible to increase the solubilization of LA by 1.5 times compared with liposomes. It was shown that NPs with LA have pronounced antioxidant and antiplatelet properties.

Цереброваскулярные заболевания являются наиболее распространенными формами патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов. К основным патогенетическим механизмам развития инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, 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 (ЛК). Однако она малорастворима в воде и, попадая в организм, быстро связывается с белками, биодеградирует, что приводит к уменьшению терапевтического действия.

Цель исследования — получение нанодисперсий (НД) с ЛК для ее солюбилизации в НЧ, медленного высвобождения, а также исследование их влияния на функциональную активность тромбоцитов.

Вначале получали наночастицы (НЧ) с ЛК. Липосомы (Лс) ФХ ЛК получали пассивной загрузкой, диспергируя липидную пленку фосфатным буферным раствором (ФБР, pH 7,4) с последующей экструзией, наноэмульсии (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 Лс с ЛК и НЭ с ЛК на основе ФХ, олигоглицерина (ОГ) и плюроника Ф68, в ФБР (pH 7,4, 0,15 мМ) с размером частиц от 25 до 310 нм. НЧ с ЛК на основе Ф68 и ОГ были электронейтральными, гетерогенными и состояли из двух фракций НЧ: 20–70 нм (20 ± 5 %) и 110–310 нм (75 ± 5 %). Было показано, что НЧ с ЛК были стабильными при длительном хранении (> 2 лет) при комнатной температуре и при +4 °C.

* Исследования выполнены в рамках гос. задания № 122051600109-5 (РНИМУ им. Н. И. Пирогова) и 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, Н. С. Шастина, О. А. Баранова, А. В. Чеканов, К. Д. Казаринов, Э. Ю. Соловьева, А. И. Федин, 2024

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 8 мг/мл, в то время как для получения Лс с ЛК использовали концентрации 1 и 5 мг/мл. При дальнейшем повышении количества ЛК в Лс 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 Лс 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 наноформ с ЛК на агрегацию тромбоцитов (Тц) в плазме крови, выделенной из крови здоровых доноров. Агрегацию Тц индуцировали арахидоновой кислотой (АК), поскольку в результате ее действия образуются различные метаболиты, в том числе продукты ПОЛ. Было показано, что Лс ЛК (1–2 мМ) снижают степень и скорость агрегации 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, НД 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. Shchelkonogov V. A., Inshakova A. M. et al. Nanoparticles of lipoic acid esters: preparation andantioxidant effect // Mend. Commun. 2021. Vol. 31. P. 507508.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-127

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ КЕРАТИНАЗЫ В ПРОДУЦЕНТЕ *BACILLUS MOJAVENSIS*

PRODUCTION OF RECOMBINANT KERATINASE IN THE PRODUCER *BACILLUS MOJAVENSIS*

Е. А. Якушева[1], Е. А. Шарлаева[1], П. В. Колосов[1], Д. Н. Щербаков[1,2]

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

E. A. Yakusheva[1], E. A. Sharlaeva[1], P. V. Kolosov[1], D. N. Scherbakov[1,2]

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

✉ elizavetaakuseva85@gmail.com

Аннотация

В связи с ростом животноводства в мире увеличивается количество кератиновых отходов, которые являются концентратом белка. Кератиназы — ферменты, которые разрушают кератин. По различным исследованиям они имеют потенциальное применение в различных областях (производство кожи, моющих средств, фармацевтических препаратов и биомедицина).

Abstract

Due to the growth of animal husbandry in the world, the amount of keratin waste, which is a protein concentrate, is increasing. Keratinases are enzymes that break down keratin. According to various studies, they have potential applications in various fields (leather production, detergents, pharmaceuticals and biomedicine).

Накопление кератинсодержащих отходов связано со структурой кератина. Она характеризуется α-спиральными (α-кератин) и β-складчатыми (β-кератин) пептидными цепочками, которые скреплены между собой большим количеством дисульфидных мостиков. Методы разложения кератина являются трудоемкими и разрушают некоторые эссенциальные аминокислоты, поэтому его деградация микроорганизмами, которые продуцируют кератиназу, имеет огромные преимущества [1].

Кератиназы относятся к классу гидролаз, подклассу пептидаз, подподклассу сериновых или металлопротеаз. Молекулярная масса, оптимальные значения pH и температур фермента имеют широкий диапазон. Механизм действия кератиназы на кератин включает два этапа: сульфитолиз и протеолиз. В результате сульфитолиза происходит разрушение дисульфидных связей. В свою очередь, протеолиз приводит к разрушению кератина до аминокислот.

В качестве природных источников кератиназы выступают бактерии и грибы [2]. Для сверхпродукции кератиназы и уменьшения стоимости эстракции и очистки фермента используются экспрессионные системы *Escherichia coli, Bacillus subtilis* и *Pichia pastoris* [3].

Цель работы — получение рекомбинантной кератиназы в продуценте *Bacillus mojavensis BDV-1*.

Амплификацию гена кератиназы проводили с использованием в качестве матрицы геномной ДНК *B. licheniformis* SCDB 14, полученную нуклеотидную последовательность встраивали в плазмидный вектор pJet1.2/blunt (ThermoFisher Scientific, США). После этого провели трансформацию в клетки *E. coli* Stbl3 (New England Biolabs, США). Нуклеотидную последовательность полученной плазмиды подтверждали секвенированием по Сэнгеру. Далее ген кератиназы был переклонирован из pJet-Ker по сайтам рестрикции BamHI и AatII в экспрессионные векторы pHT255 и pBSU. Полученными экспрессионными плазмидами трансформировали клетки *Bacillus mojavensis BDV-1* методом электропорации.

Литература

1. Чиндарева М. А., Казловский И. С., Зинченко А. И. получение штамма *Escherichia coli* — продуцента кератиназы *Bacillus licheniformis* // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2021. Т. 13. С. 143–152.

2. Vidmar B., Vodovnik M. Microbial keratinases: enzymes with promising. Biotechnological applications // Food Technol. Biothechnol. 2018. Vol. 56, No. 3. P. 312–328.

3. Чиндарева М. А., Казловский И. С., Казаков Р. В., Зинченко А. И. Создание рекомбинантного штамма *Pichia pastoris* — продуцента кератиназы бактерий *Bacillus licheniformis* БИМ В-800 // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2022. Т. 14. С. 197–208.

© Е. А. Якушева, Е. А. Шарлаева, П. В. Колосов, Д. Н. Щербаков, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-128

ГАЛОНИТРО-ТРИТЕРПЕНОИДЫ — ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ КОВАЛЕНТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПЕПТИДАМИ И БЕЛКАМИ *

HALONITRO-TRITERPENOIDS — PROMISING AGENTS OF COVALENT INTERACTION WITH PEPTIDES AND PROTEINS

Э. Ю. Ямансаров[1,2], О. Б. Казакова[3]

[1] *Башкирский государственный медицинский университет, Уфа*
[2] *Уфимский государственный нефтяной технический университет*
[3] *Уфимский институт химии, УФИЦ РАН*

E. Y. Yamansarov[1,2], O. B. Kazakova[3]

[1] *Bashkir State Medical University, Ufa*
[2] *Ufa State Petroleum Technological University*
[3] *Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Center RAS*

✉ eyuyamansarov@bashgmu.ru

Аннотация

Разработка новых методов и реагентов для селективного взаимодействия с остатками цистеина является актуальной задачей в биоконъюгации, медицинской химии, химической биологии. С целью развития нового подхода ковалентной модификации тиолов в настоящей работе осуществлен синтез галонитро-производных тритерпеноидов — перспективных агентов, содержащих в себе реакционноспособный электрофильный центр.

Abstract

The development of new methods and reagents for selective interaction with cysteine residues is an urgent task in bioconjugation, medicinal chemistry, and chemical biology. To develop a new approach of covalent modification with thiols, we synthesized halonitro derivatives of triterpenoids — promising agents with a reactive electrophilic center.

Биоконъюгация — современная область исследований, которая посвящена синтезу конъюгатов и гибридов, а также разработке селективных методов химической модификации биополимеров и их олиго- и мономерных единиц: белков, пептидов, аминокислот; углеводов и олигосахаридов; ДНК, РНК и олигонуклеотидов и др. Исследователям для биоконъюгации доступен широкий спектр методов органического синтеза: клик-химия, реакции нуклеофильного замещения, электрофильное замещение в ароматическом кольце, синтез оснований Шиффа, металлокомплексный катализ и т. д. При этом цистеин является наиболее удобной мишенью ввиду исключительной нуклеофильности депротонированной формы сульфгидрильной группы боковой цепи [1]. Кроме того, распространенность цистеина в природных протеинах невелика (всего 1–2 %), и, как правило, только несколько его остатков являются доступными для химической модификации (экспонированы в раствор), что позволяет селективно и контролируемо модифицировать незначительное количество участков белков. Таким образом, цистеин является более предпочтительной мишенью в сравнении с аминогруппами остатков лизина или N-конца пептидной цепи.

Самым распространенным методом работы с SH-группой в пептидах и белках является реакция нуклеофильного замещения. Среди реагентов общепринятым считается α-галокарбонильные соединения, такие как йодацетамид или остатки хлоруксусной кислоты, первые сообщения о которых появились более 85 лет назад [2].

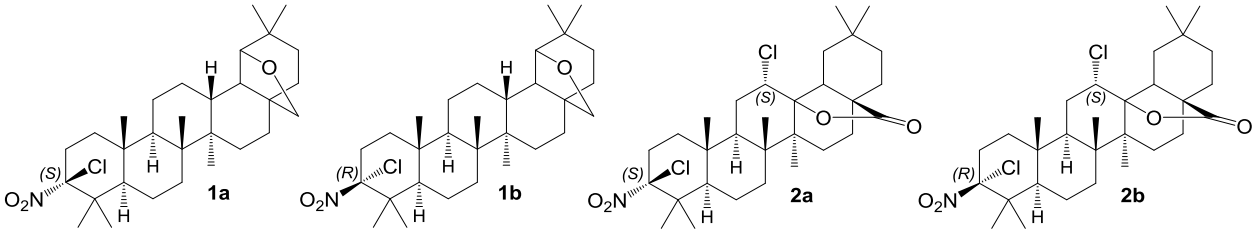
Несмотря на то что соответствующие малеимиды являются более популярными реагентами благодаря более высокой скорости и специфичности реакции, галоацетильное конъюгирование находит широкое применение за счет стабильности продуктов реакции, компактного размера вводимой функции, возможности усилить конверсию реакции за счет варьирования типа галогенид-аниона (I > Br > Cl).

При всех преимуществах α-галокарбонильных соединений они обладают рядом недостатков, ограничивающих их применение. К ним относится в первую очередь кросс-реактивность по отношению к остаткам лизина, метионина, гистидина. Наиболее существенным недостатком является неудовлетворительная кинетика процесса

* Исследование выполнено при поддержке гранта Республики Башкортостан молодым ученым в 2023 г.
© Э. Ю. Ямансаров, О. Б. Казакова, 2024

взаимодействия с цистеином. Применение α-йодацетильной группы как самой реакционноспособной осложняет процесс наличием свободного йода в растворе, который способен побочно реагировать с ароматическими аминокислотами в составе белков: тирозином, фенилаланином, гистидином, триптофаном.

В настоящей работе нами осуществлен синтез новых производных тритерпеноидов олеананового ряда, несущих в своей структуре гем-нитрохлорозамещенный атом углерода (см. рисунок), который, согласно литературным данным, способен вступать в реакции нуклеофильного замещения с тиолами [3]. Авторы предложили использовать подобные соединения в качестве ковалентных ингибиторов белковых мишеней. В настоящее время соединения **1** и **2** находятся на исследовании их биологической активности: цитотоксичности, противовоспалительного действия, реакционной способности к тиолам и цистеину и др.



Структура галонитро-производных тритерпеноидов **1** и **2**

Таким образом, полученные производные тритерпеноидов являются перспективными соединениями для взаимодействия с цистеином и конъюгации с биомакромолекулами, что может найти отражение в ковалентном ингибировании белков, изучении их механизма биологического действия, синтезе фармакологически активных белковых или пептидных гибридов и др.

Литература

1. Brotzel F., Mayr H. Nucleophilicities of amino acids and peptides // Organic Biomol. Chem. 2007. Vol. 5. P. 3814–3820.

2. Goddard D. R., Michaelis L. Derivatives of keratin // J. Biol. Chem. 1935. Vol. 112. P. 361–371.

3. Chen F. Y., Xiang L., Zhan G. et al. Highly stereoselective organocatalytic synthesis of pyrrolidinyl spirooxindoles containing halogenated contiguous quaternary carbon stereocenters // Tetrahedron Lett. 2020. Vol. 61. P. 151806.

РАЗДЕЛ III

БИОФИЗИКА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-129

OPTICAL CONTROL OF INTERCELLULAR CALCIUM DYNAMICS IN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED CARDIOMYOCYTES WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY*

R. Alkhateeb[1], I. S. Semidetnov[1], S. A. Romanova[1], M. M. Slotvitsky[1,2], V. A. Tsvelaya[1,2], K. I. Agladze[1,2]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute*

✉ rosskhati75@gmail.com

Abstract

Since the treatment of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is symptomatic and given the lack of early diagnostic methods [1], the development of targeted therapies and diagnostic tools that can detect early alterations in excitation abnormalities in HCM patients is important to improve the condition of the patients and stop the progression of the disease. Implementing patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes has an advantage as it allows testing specific therapeutic interventions for a specific case. Moreover, the combination of experimental and computational approaches to explore additional parameters and mechanisms involved in HCM, will help uncover new therapeutic targets and strategies.

Hypertrophic cardiomyopathy is one of the most common inherited cardiovascular diseases affecting one in 500 people globally [2]. It is mainly caused by mutations encoding sarcomere-associated proteins [3]. The most common treatment options for HCM are those that aim to relieve the symptoms and the risk of sudden cardiac death [4]. However, there is still no efficient treatment for HCM and a better understanding of the pathogenicity of this disease will help to improve early diagnostic and therapeutic methods. Using induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes model is of great importance that enables us to study HCM features . In this study, two iPSC lines, including a control cell line (m34Sk3) and patient-derived cell line (HCM-11f3), were differentiated into cardiomyocytes. Optical mapping was conducted at different timepoints of the differentiation process to measure calcium and voltage changes. Computational modeling approach was also applied to investigate the changes in calcium dynamics. Results showed differences in HCM features like calcium concentration before the 30th day of the differentiation process in the diseased cell line. In order to use the experimentally measured action potential as input data for modeling, removing the noise using activation map seemed to be efficient for our data. Computational modeling results showed the main parameters that may affect the differences in calcium dynamics between healthy and diseased cell lines.

This study will help to develop a more detailed understanding and description of the calcium disturbance mechanisms in hypertrophic cardiomyopathy. Moreover it will develop a better understanding of the arrhythmia occurrence and further improve the diagnostics and the therapeutics methods of HCM and arrhythmia.

References

1. Martinez E. C., Ortiz-Garcia N. Y., Hernandez D. A.H. et al. Hypertrophic cardiomyopathy diagnosis and treatment in high- and low-income countries: a narrative review // Cureus. 2023. Vol. 15(10): e46330.

2. Dementyeva E. V., Medvedev S. P., Kovalenko V. R. Applying patient-specific induced pluripotent stem cells to create a model of hypertrophic cardiomyopathy // Biochemistry (Moscow). 2019. Vol. 84. P. 291–298.

3. Glavaški, M., Velicki, L., & Vučinić, N. et al. Hypertrophic cardiomyopathy: Genetic foundations, outcomes, interconnections, and their modifiers // Medicina. 2023. Vol. 59(8): e1424.

4. Palandri C., Santini L., Argirò A. et al. Pharmacological management of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to bedside // Drugs. 2022. Vol. 82(8). P. 889–912.

* The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the scope of the government assignment (Agreement 075-03-2023-106 13 January 2023).

© R. Alkhateeb, I. S. Semidetnov, S. A. Romanova, M. M. Slotvitsky, V. A. Tsvelaya, K. I. Agladze, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-130

RECENT ADVANCEMENTS IN COARSE-GRAINED SIMULATIONS OF BIOMOLECULAR SYSTEMS *

M. E. Bozdaganyan, P. S. Orekhov

Shenzhen MSU-BIT University, China

✉ orekhov_p@smbu.edu.cn

Abstract

Over recent decades, computer simulations of proteins and other biological molecules have become a powerful tool, providing high-resolution insights into the dynamics of biological systems. The demand for simulations on larger time and length scales has led to the development of coarse-grained techniques, which simplify models by substituting groups of atoms with single particles, or 'beads'. These methods enable comprehensive exploration of complex phenomena, such as membrane dynamics and protein interactions, while reducing computational costs compared to all-atom simulations. This talk will highlight recent advancements in coarse-grained simulations, illustrated by diverse examples and discuss the limitations and challenges of popular coarse-grained models, proposing potential strategies for improvement.

Particularly, we will discuss the application of coarse-grained techniques at the early stages of drug development. Binding site prediction is one of critical area, which can be enhanced by coarse-grained simulations. We have recently proposed a cloud-based approach, Colabind [1], employing coarse-grained molecular dynamics simulations with molecular probes mimicking drug-like fragments for identification of potential binding sites of small molecular weight compounds. Colabind demonstrates high effectiveness across diverse biological targets, successfully identifying orthosteric binding sites and known druggable allosteric or PPI sites in both experimentally determined and AI-predicted protein structures. These findings provide valuable insights for pharmacophore hypothesis development, illustrating the potential of CG simulations in identifying and optimizing therapeutic targets.

Exploring the mechanical properties of cellular components such as microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) under mechanical loads offer another fascinating application of CG simulations. MAPs play crucial roles in linking microtubules with other cellular structures, and understanding their mechanical properties is vital for insights into cellular processes. Using CG molecular dynamics and Brownian dynamics simulations, we have investigated the asymmetric unbinding of the NDC80 complex from microtubules under directional load. The stiff stalk of NDC80, tilted toward the plus-end, creates a lever arm critical for asymmetric unbinding, unlike EB-proteins, PRC1, and kinesins, which lack pronounced unbinding asymmetry. These findings highlight design principles of MAPs, explaining how their distal parts modulate unbinding under external loads and informing the design of synthetic protein systems with predefined mechanical characteristics [2].

In the realm of membrane biophysics, the study of amphiphilic copolymers composed of styrene/maleic acid (SMA) monomers and diisobutylene/maleic acid (DIBMA) monomers [3] showcases another significant application of coarse-grained simulations. These copolymers have revolutionized membrane protein research by directly releasing phospholipids and membrane proteins from lipid bilayers, yielding stable water-soluble discoidal SMA/lipid particles (SMALPs) [4, 5]. Using a CG molecular model, molecular dynamics simulations revealed that SMA copolymers aggregate into clusters further interacting with membranes. The clusters of polymers with different ratio of styrene and maleic acid units interact with membranes in different fusion, with the polymers of 3:1 ratio extracting lipid patches to form SMALP-like structures. These results suggest that copolymer molecules with a sufficient number of sequential styrene monomers are necessary for SMALP formation, aligning with experimental data.

CG simulations can also provide critical insights in addressing public health challenges. In another recent publication [6], we have investigated interactions of common antiseptics with bacterial membranes. Cationic antiseptics are essential for combating bacterial and viral infections, and their mechanisms of action are crucial for developing effective treatments remaining elusive. CG molecular dynamics simulations revealed distinct patterns of membrane alterations induced by different antiseptic compounds. While none caused bilayer disintegration, their adsorption increased membrane vulnerability to poration under an external electric field and, plausibly, other types of external stress. This enhanced pore formation likely contributes to their cytotoxic action, offering valuable information for designing more effective antimicrobial agents.

* P. Orekhov is a member of an innovative drug development team based on structural biology and bioinformatics at Shenzhen MSU-BIT University #2022KCXTD034.

© M. E. Bozdaganyan, P. S. Orekhov, 2024

Lastly, the ongoing threat of coronaviruses, especially SARS-CoV-2, underscores the importance of detailed investigations aimed at understanding viral protein functions. Using CG molecular dynamics simulations, we analyzed the structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope (E) protein [7]. The hydrophobic transmembrane domain (TMD) and amphiphilic helices H2 and H3 display specific orientations influenced by palmitoylation and glycosylation. The E protein generates and senses membrane curvature, localizing to convex regions, which may facilitate oligomer assembly and viral particle budding. These results enhance our understanding of structure-function relations for E protein and other viroporins, aiding efforts to combat COVID.

Despite the significant advancements and applications of coarse-grained simulations, several limitations and challenges remain, such as the loss of detailed atomic interactions, limitations in modeling specific molecular interactions, and potential inaccuracies in kinetics predictions. Addressing these challenges requires ongoing development of more sophisticated CG models, integration with all-atom simulations, and validation against experimental data.

In conclusion, coarse-grained simulations have become indispensable in molecular biophysics, enabling the exploration of complex biological systems with reduced computational costs. The examples discussed demonstrate the versatility and power of CG approaches in studying protein structure, binding site prediction, load-bearing properties of MAPs, polymer interactions with membranes, mechanisms of action of antiseptic compounds, and viral protein dynamics. Continued advancements and refinements in CG models will further enhance our understanding of biological processes and support the development of new therapeutic strategies.

References

1. Andreev G., Kovalenko M., Bozdaganyan M., Orekhov P. Colabind: A Cloud-Based Approach for Prediction of Binding Sites Using Coarse-Grained Simulations with Molecular Probes // The Journal of Physical Chemistry B. 2024. Vol. 128(13). P. 3211–3219.

2. Kovalenko I. B., Kholina E. G., Fedorov V. A. et al. Control of the force-bearing properties of microtubule-associated proteins via stalk/linker regions: insights from the NDC80 complex // Under review.

3. Orekhov P. S. et al. Mechanisms of Formation, Structure, and Dynamics of Lipoprotein Discs Stabilized by Amphiphilic Copolymers: A Comprehensive Review // Nanomaterials. 2022. Vol. 12(3). P. 361.

4. Voskoboynikova N., Orekhov P. S., Bozdaganyan M. E. et al. Lipid dynamics in diisobutylene-maleic acid (DIBMA) lipid particles in presence of sensory rhodopsin II // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22(5). P. 2548.

5. Orekhov P. S. et al. Styrene-maleic acid copolymers form SMALPs by pulling lipid patches out of the lipid bilayer // Langmuir. 2019. Vol. 35(10). P. 3748-3758.

6. Kholina E. G., Kovalenko I. B., Bozdaganyan M. E. et al. Cationic Antiseptics Facilitate Pore Formation in Model Bacterial Membranes // The Journal of Physical Chemistry B. 2020. Vol. 124(39). P. 8593–8600.

7. Kuzmin A., Orekhov P. S., Astashkin R. et al. Structure and dynamics of the SARS-CoV-2 envelope protein monomer // Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2022. Vol. 90(5). P. 1102–1114.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-131

DETERMINATION OF THE SPATIAL STRUCTURE OF A DNA DUPLEX WITH A NON-COMPLEMENTARY CU PAIR BY NMR SPECTROSCOPY*

E. I. Kunina[1,3], A. V. Shernyukov[1], A. V. Yudkina[2],
D. O. Zharkov[2,3], E. G. Bagryanskya[1]

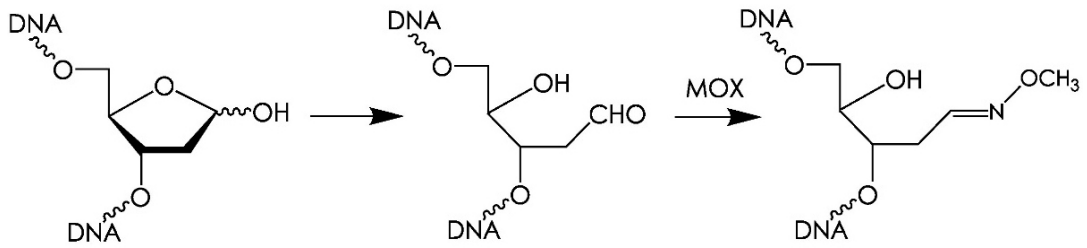
[1]*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*
[2]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[3]*Novosibirsk State University*

✉ e.kunina@g.nsu.ru

Abstract

DNA molecules are constantly being damaged. In human cells the amount of damage can reach several thousand per cell per day. This damage includes changes in the chemical structure of DNA, chain breakage or the presence of incorrect bases or their fragments. However, cells have repair systems to help repair these damages. The study of processes modeling DNA repair is an urgent task, since DNA damage is the cause of many diseases. DNA structures with AP sites can be used to develop drugs to treat tumors and other conditions.

In this study, we focused on the structural characteristics of a DNA duplex containing a methoxyamine AP site (see Figure). This site is of particular interest due to its potential as an antitumor agent that is currently undergoing clinical trials. Methoxyamine is known to cause specific DNA damage by forming adducts, which leads to changes in the structure of DNA that can affect its stability and functionality. Understanding these modifications is crucial for evaluating the therapeutic efficacy and safety of methoxyamine in clinical settings.



Methoxyamine derivative of the AP site

To gain insight into the structural dynamics of DNA modified with methoxyamine, we use a duplex containing an irregular CU pair as a reference model. This CU pair serves as a valuable tool for understanding how non-canonical base pairs affect the overall stability and conformation of DNA. By examining the duplex of the CU pair, we can establish a model for comparing the structural effects caused by the modification of methoxyamine.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was used in this study mainly because of its ability to provide detailed information about the structure and dynamics of nucleic acids in solution. NMR allows us to observe the conformational states of the DNA duplex, especially in the presence of non-canonical base pairs such as CU pairs. This method is especially useful for studying dynamic processes such as the rapid exchange between different structural forms, which is crucial for understanding how DNA reacts to damage and modification.

The work investigated the NMR spectra of the duplex in the H_2O + D_2O system. From the temperature dependence of the spectra, it can be concluded that the C-G pairs located between the terminal pairs and AT pairs are sufficiently strong, which indicates the formation of stable B-type helices in these fragments. Some signals, especially those associated with CU and nearby base pairs, become narrower with increasing temperature, indicating the presence of rapid exchange between structures due to the process occurring in the central region, which contains a non-complementary CU base pair.

* This work was supported by the state task of Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences in the area of basic research (registration number 122040800265-0).

© E. I. Kunina, A. V. Shernyukov, A. V. Yudkina, D. O. Zharkov, E. G. Bagryanskya, 2024

References

1. Helbock H. J., Beckman K. B., Shigenaga M. K. et al. DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998. Vol. 95(1). P. 288–293.

2. Kaeser P. S., Regehr W. G. Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release // Annual review of physiology. 2014. Vol. 76. P. 333–363.

3. Kozarich J. W., Worth L. Jr., Frank B. L. et al. Sequence-specific isotope effects on the cleavage of DNA by bleomycin // Science. 1989. Vol. 245 (4924). P. 1396–1399.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-132

DIPOLAR EPR SPECTROSCOPY OF FULLERENE AND PORPHYRIN SYMMETRIC PAIRS

R.A. Podarov[1,2], M.I. Kolokolov[1,2], E.V. Tretyakov[3], M.V. Fedin[1], O.A. Krumkacheva[1]

[1] *International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State University*
[3] *N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow*

✉ podarov.r@tomo.nsc.ru

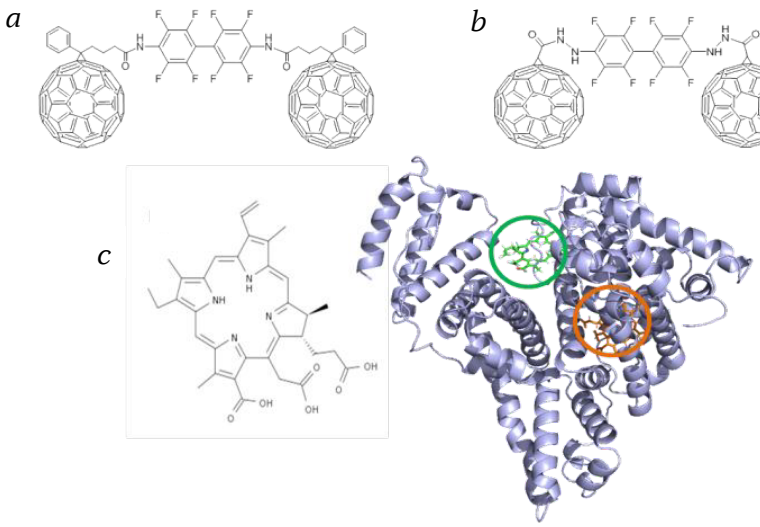
Abstract

This work introduces a dipole electron paramagnetic resonance (EPR) approach for measuring distances in symmetric non-orthogonal photoexcited spin pairs, aiming to enhance sensitivity of pulsed EPR techniques. Using fullerene and porphyrin-based pairs, the study explores intermolecular distances, spectral features, proposing a methodology for nanometer-scale distance measurements in such systems with potential applications in biological contexts.

In this work, we introduce for the first time a dipole electron paramagnetic resonance (EPR) approach for measuring distances in symmetric non-orthogonal photoexcited spin pairs. Previous research has effectively explored spin pairs consisting either of a photoexcited triplet state of a molecule paired with a stable radical [1, 2], or two photoexcited triplet states of different natures [3]. The subsequent phase involves examining a coupled system containing two photoexcited triplet states to potentially enhance the sensitivity of pulsed EPR techniques through the intensified hyperpolarized signal emanating from two identical components of the pair. Furthermore, such symmetrical systems are increasingly utilized in the efficient conversion of solar energy into electrical energy. Despite the theoretical efficiency limit of contemporary solar cells being only 34 %, utilizing the singlet fission process in such symmetric spin pairs could elevate this efficiency to 44 %. This increase is facilitated by the generation of two charge carriers rather than one, a process hindered by intersystem crossing (ISC) in spin pairs, which does not contribute to an efficiency gain in solar cells [4].

The aim of this work is to develop an approach for measuring nanometer-scale distances using electron paramagnetic resonance (EPR) in symmetric photoexcited spin pairs based on fullerene and porphyrin. The investigations were conducted using molecules of bisfullerene connected by a fluorinated linker, and pairs of chlorin e6 molecules in complex with human serum albumin.

The echo-detected spectra of the bisfullerene molecules revealed several noteworthy effects and distinctions compared to the monomeric form of PCBM. The spectrum of the bisfullerene was notably broader and featured a distinct set of spectral lines. Utilizing a theoretical framework that involves strongly interacting spins within fullerene pairs,



Structures of the studied spin pairs: *a* — bisfullerene with a long linker, *b* — bisfullerene with a short linker, *c* — chlorine molecule e6 and its complex with human serum albumin

© R.A. Podarov, M.I. Kolokolov, E.V. Tretyakov, M.V. Fedin, O.A. Krumkacheva, 2024

coupled with considerably weaker dipolar interactions between the fullerenes, enabled the simulation of the echo-detected spectrum and the estimation of inter-fullerene distances using the point dipole approximation. Data derived from nutation experiments and subsequent modeling suggest that the formation of the two triplet states in the system under investigation occurs not via inter-combination conversion, but through the mechanism of singlet fission.

However, not all transitions within the triplet state spectra were accurately described by the existing model. During experiments with a delayed interval post-laser pulse, a spectral line emerged, associated with the coherence transfer of transitions having closely matched frequencies. Throughout the course of the experiments, a general decline in the intensity of the echo-detected spectrum was observed, alongside a notable peak at the center. Additionally, a resolution of the two extreme lines of the original triplet spectrum and a reversal in the sign of one of the spectrum lines were detected. These observed effects could be further modeled by considering an exchange interaction between the paired fullerenes.

We proposed a methodology for measuring distances in symmetric photoexcited spin pairs using the relaxation-induced dipole modulation enhancement (RIDME) pulsed EPR technique. The experimental label spacing determined in bisfullerene aligns with estimates derived from ED spectrum modeling. Additionally, this approach enabled the first-time measurement of the distance between two binding sites of chlorin e6 with albumin. The RIDME technique has thus proven effective for probing nanometer-scale distances in symmetric photoexcited spin pairs, including applications in biological systems. This method utilizes the high quantum yield of photoexcited triplet states and overcomes a significant limitation of dipolar methods — the presence of a broad echo-detected spectrum.

References

1. Krumkacheva O.A. et al. Triplet fullerenes as prospective spin labels for nanoscale distance measurements by pulsed dipolar EPR spectroscopy //Angewandte Chemie International Edition. 2019. Vol. 58, №. 38. P. 13271–13275.

2. Di Valentin M. et al. Porphyrin triplet state as a potential spin label for nanometer distance measurements by PELDOR spectroscopy //Journal of the American Chemical Society. 2014. Vol. 136, №. 18. P. 6582–6585.

3. Bertran A. et al. Light-induced triplet–triplet electron resonance spectroscopy // The journal of physical chemistry letters. 2020. Vol. 12, №. 1. P. 80-85.

4. Smith M.B., Michl J. Recent advances in singlet fission // Annu. Rev. Phys. Chem. 2013. Vol. 64. P. 361–386.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-133

СОЗДАНИЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА И ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛЕСТЕРОЛА ДЛЯ ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК *

DEVELOPMENT OF LIPID NANOPARTICLES BASED ON APOLIPOPROTEIN MIMETICS AND CHOLESTEROL DERIVATIVES FOR SMALL INTERFERING RNA DELIVERY

В. М. Абашкин[1], В. А. Жогла[1], А. О. Игнатьев-Качан[2],
О. Л. Шарко[3], В. В. Шманай[3], Д. Г. Щербин[1]

[1] *Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск*
[2] *Корейский институт науки и технологий, Сеул*
[3] *Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск*

V. M. Abashkin[1], V. A. Zhogla[1], A. O. Ihnatsyeu-Kachan[2],
O. L. Sharko[3], V. V. Shmanai[3], D. G. Shcharbin[1]

[1] *Institute of Biophysics and Cell Engineering NAS of Belarus, Minsk*
[2] *Korea Institute of Science and Technology, Seoul*
[3] *Institute of Physical Organic Chemistry NAS of Belarus, Minsk*

✉ viktar.abashkin@gmail.com

Аннотация

Доставка малых интерферирующих РНК посредством биосовместимых наноструктур является перспективным подходом в генетической терапии онкологических заболеваний. Нами разработаны подходы по созданию липидных наноструктур на основе производных холестерола и спермина с аполипопротеином.

Abstract

Delivery of small interfering RNA using biocompatible nanostructures is a promising approach for genetic therapy of cancer. In our work, we have developed approaches to create lipid nanostructures based on cholesterol and spermine derivatives with apolipoprotein.

Последние десятилетия научное сообщество начинает успешно внедрять различные подходы в генетической терапии онкологических заболеваний, в том числе основанные на РНК-интерференции с использованием малых интерферирующих РНК (миРНК). Основное препятствие применения миРНК в качестве лекарственного агента — их доставка к целевым органам и тканям. В этой связи ведутся разработки различных наноносителей, в том числе использующих природные механизмы доставки, например, посредством наночастиц на основе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Эти частицы состоят из биологических молекул, таких как фосфолипиды, простые эфиры холестерина и аполипопротеины, что обеспечивает их высокую биосовместимость [1].

В нашей работе получены новые ионизируемые липиды (ИЛ) на основе холестерола и полиаминов (сперминов), а также проведен сравнительный анализ их эффективности для доставки миРНК и коммерчески доступных соединений. Исследуемые соединения структурно схожи с холестеролом и его эфирами, содержащимися в природных ЛПВП. Мы оценили способность наночастиц (НЧ) на основе ЛПВП с исследуемыми ИЛ образовывать комплексы миРНК, а также их цитотоксичность, уровни клеточного поглощения и эффективность замалчивания генов.

Было показано, что ключевую роль в формировании ЛПВП играет не только миРНК-связующий агент, но также состав фосфолипидов НЧ ЛПВП. Кроме того, уровни клеточного поглощения сильно зависят от типа клеток-мишеней.

Новые ИЛ продемонстрировали различные структурно-зависимые способности к связыванию миРНК с НЧ ЛПВП. С учетом структуры ИЛ они могут индуцировать токсичность полученных НЧ ЛПВП и влиять на их биологические функции. Состав фосфолипидов НЧ ЛПВП играл решающую роль не только в физико-химических свойствах частиц, таких как гидродинамический размер, но также и в эффективности клеточного поглощения миРНК. Внутриклеточный транспорт миРНК варьировался в зависимости от типа клеток.

* Работа выполнена за счет грантов БРФФИ Б24КИ-077, Б21КОРГ-001.

© В. М. Абашкин, В. А. Жогла, А. О. Игнатьев-Качан, О. Л. Шарко, В. В. Шманай, Д. Г. Щербин, 2024

Так, в макрофагах миРНК локализовались только в лизосомах, в то время как в клетках HepG2 наблюдалось требуемое равномерное цитозольное распределение. Тем не менее, несмотря на успешную доставку миРНК в клетки рака печени, замалчивание генов было слабым, вероятно, из-за недостаточного высвобождения миРНК из наночастиц ЛПВП.

Таким образом, потенциально наночастицы на основе производных холестерола и сперминов могут служить в качестве векторов доставки миРНК. Будущие исследования будут сосредоточены на понимании внутриклеточных барьеров на пути эффективного замалчивания генов и оптимизации интернализации миРНК с помощью ИЛ.

Литература

1. Mo Z.-C. et al. A high-density lipoprotein-mediated drug delivery system // Advanced Drug Delivery Reviews. 2016. Vol. 106. P. 132–147.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-134

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЭФАПТИЧЕСКОЙ СВЯЗИ КАРДИОМИОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ОДНОНАПРАВЛЕННОГО БЛОКА ПРОВЕДЕНИЯ

STUDY OF THE ROLE OF EPHAPTIC COUPLING OF CARDIOMYOCYTES IN THE FORMATION OF UNIDIRECTIONAL CONDUCTION BLOCK

С. С. Бакуменко[1,3], С. А. Романова[1,2], А. А. Аитова[1], В. Д. Наумов[1], И. С. Семидетнов[1], А. К. Бережной[1–3], М. М. Слотвицкий[1,2], В. А. Цвелая[1–3], К. И. Агладзе[1,2]

[1]Московский физико-технический институт, Долгопрудный
[2]Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского
[3]Университет ИТМО, Санкт-Петербург

S. S. Bakumenko[1,3], S. A. Romanova[1,2], A. A. Aitova[1], V. D. Naumov[1], I. S. Semidetnov[1], A. K. Berezhnoi[1–3], M. M. Slotvitsky[1,2], V. A. Tsvelaya[1–3], K. I. Agladze[1,2]

[1]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
[2]Moscow Regional Research Clinical Institute named after M. F. Vladimirsky
[3]ITMO University, Saint Petersburg

✉ bakumenko.ss@phystech.edu

Аннотация

Сердечные аритмии представляют собой одну из главных причин смертности, связанной с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В работе исследуется влияние функциональной неоднородности сердечной ткани на возникновение аритмий и представлены системы скрининга на кардиотоксичность, учитывающие эти неоднородности. Основной целью исследования является разработка *in vitro* и *in silico* систем скрининга на кардиотоксичность, учитывающих неоднородность сердечной ткани. Экспериментальная часть исследования включает в себя культивирование кардиомиоцитов, выделенных из предсердной ткани человека, изучение упругости их мембран с помощью атомно-силовой микроскопии, иммуноцитохимическое окрашивание клеток и анализ морфологии клеток с использованием конфокальной микроскопии. *In silico* заключается в создании гетерогенной модели сердечной ткани, которая используется для исследования влияния межклеточных неоднородностей на условия формирования первичных волн-реентри. Для этого применяются методы компьютерного зрения и моделирования трансмембранных токов. Исследование вносит значительный вклад в понимание механизмов возникновения сердечных аритмий и предлагает новые подходы к оценке кардиотоксичности препаратов. Разработанные системы скрининга могут быть полезны для предсказания кардиотоксичности новых лекарственных средств, что имеет большое значение для медицины и фармакологии.

Abstract

Cardiac arrhythmias represent a major cause of cardiovascular-related mortality. This work investigates the influence of functional heterogeneity of cardiac tissue on the occurrence of arrhythmias and develops cardiotoxicity screening systems that take these heterogeneities into account. The main goal of the study is to develop *in vitro* and *in silico* screening systems for cardiotoxicity that take into account the heterogeneity of cardiac tissue. The experimental part of the study includes culturing cardiomyocytes isolated from human atrial tissue, studying the elasticity of their membranes using atomic force microscopy, immunocytochemical staining of cells and analyzing cell morphology using confocal microscopy. The *in silico* approach is to create a heterogeneous model of cardiac tissue, which is used to study the influence of intercellular heterogeneities on the conditions for the formation of primary reentry waves. For this purpose, computer vision and transmembrane current modeling techniques are applied. The study makes a significant contribution to the understanding of the mechanisms of cardiac arrhythmias and offers new approaches to the assessment of cardiotoxicity of drugs. The developed screening systems may be useful for predicting the cardiotoxicity of new drugs, which is of great importance for medicine and pharmacology.

Сердечная ткань очень неоднородна по своей структуре, что существенно влияет на устойчивость проведения волны возбуждения. Важнейшим следствием гетерогенности данной ткани является возможное развитие функциональных блоков с последующим формированием спиральных волн-реентри. В большинстве случаев гомогенная модель сердечной ткани достаточна для исследования динамики и взаимодействия спиральных волн [1],

© С. С. Бакуменко, С. А. Романова, А. А. Аитова, В. Д. Наумов, И. С. Семидетнов, А. К. Бережной, М. М. Слотвицкий, В. А. Цвелая, К. И. Агладзе, 2024

поскольку характерный размер ядра реентри значительно превышает характерный размер межклеточных неоднородностей в сердечной ткани, которые могут быть представлены в виде межклеточных связей с различной проводимостью (щелевые контакты и регионы с эфаптической связью). Однако механизм формирования первичных спиральных волн в ткани сердца до сих пор не изучен [2] и может не иметь полного объяснения в гомогенной модели. Влияние межклеточных неоднородностей на формирование первичных реентри может быть значительно более значимым, чем воздействие на динамику спиральных волн: критический радиус кривизны волнового фронта имеет размеры, сопоставимые с размерами межклеточных неоднородностей [3], и, следовательно, такие неоднородности могут влиять на формирование однонаправленного блока, необходимого для возникновения реентри.

Целью работы является создание гетерогенной модели сердечной ткани для исследования влияния межклеточных неоднородностей на условия формирования первичных волн-реентри. В компьютерной модели распределение участков с различной проводимостью (щелевые контакты, регионы с эфаптической связью, непроводящие участки) достигнуто при помощи клеточной модели Поттса, распределяющей неоднородности соответственно минимуму гамильтониана системы [4]. При помощи экспериментов *in silico* в данной модели предложен механизм повышенной аритмогенности, связанный с подавлением эфаптической межклеточной связи. Реализация такой гипотезы через изменение свойств мембраны кардиомиоцитов может объяснить повышение аритмогенности без влияния на работу ионных каналов [5]. Для проверки данного механизма разработана экспериментальная система, включающая в себя протокол выделения человеческих сердечных клеток из биоптата предсердий (ушко предсердия), их дальнейшую культивацию и исследование свойств мембраны при совмещении флуоресцентной и атомно-силовой микроскопии (методом force-modulation) после добавления исследуемых веществ. Подтверждено изменение свойств мембраны для двух препаратов (противораковой препарат циклофосфамид и фотосенсибилизатор), коррелирующее с повышенной вероятностью возникновения волн-реентри, обнаруженной в экспериментах по оптическому картированию волны возбуждения. Исследование данного механизма позволит повысить эффективность доклинического тестирования лекарственных средств на кардиотоксичность, а также найти способы минимизации побочных эффектов, связанных с подавлением эфаптической межклеточной связи.

Литература

1. Ten Tusscher K. H.W.J., Panfilov A. V. Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2006. Vol. 291(3). P. 1088–1100.

2. Majumder R., Pandit R., Panfilov A. V. Turbulent electrical activity at sharp-edged inexcitable obstacles in a model for human cardiac tissue // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2014. Vol. 307(7). P. 1024–1035.

3. Kadota S. et al. Curvature-dependent excitation propagation in cultured cardiac tissue // Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters. 2012. Vol. 94. P. 824–830.

4. Kalinin A. et al. Modeling the functional heterogeneity and conditions for the occurrence of microreentry in procedurally created atrial fibrous tissue // Journal of Applied Physics. 2023. Vol. 134(5): e054702.

5. Podgurskaya A. D. et al. Cyclophosphamide arrhythmogenicitytesting using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes // Scientific Reports. 2021. Vol. 11(1). P. 1–13.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-135

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СИНТЕЗА ЛЕГИРОВАННОГО ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННОГО АДАПТОГЕННОГО ПРЕПАРАТА *

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE SYNTHESIS OF A DOPED POLYMER MATRIX FOR THE CREATION AN INNOVATIVE ADAPTOGENIC MEDICINE

О. Я. Березина, П. И. Ерохова, А. А. Широкая, П. О. Ляшков

Петрозаводский государственный университет

O. Ya. Berezina, P. I. Erokhova, A. A. Shirokaya, P. O. Lyashkov

Petrozavodsk State University

✉ berezina@petrsu.ru

Аннотация

Рассматриваются методики синтеза матрикса, состоящего из нанонитей растворимого в воде и этиловом спирте биосовместимого полимера поливинилпирролодона, легированного ионами железа с различными концентрациями. Описываются параметры синтеза методом электроспиннинга. Полимерный матрикс изготавливается для получения нового адаптогенного препарата методом мягкой иммобилизации лактобактерий.

Abstract

Methods of synthesizing a matrix consisting of nanofilaments of water- and ethyl alcohol-soluble biocompatible polymer polyvinylpyrrolodone doped with iron ions of different concentrations are considered. The synthesis parameters by electrospinning method are described. The polymeric matrix is fabricated to produce a new adaptogenic medicine by soft immobilization of lactobacilli.

В настоящее время существуют различные методы иммобилизации бактерий, реализуемые в процессе создания адаптогенных препаратов: связывание на твердом носителе, включение в пространственную структуру носителя, иммобилизация с использованием мембранной технологии [1]. К примеру, иммобилизация на твердом носителе — активированном угле — применяется для повышения ферментативной активности бактерий. Однако препараты, полученные данным методом, нельзя считать полностью безопасными, ведь твердый носитель содержит в себе неорганические примеси в природных или ископаемых продуктах, очистка от которых является высоко затратным процессом и потому практически не производится [2].

С 2017 г. нашей группой ведутся разработки нового метода иммобилизации бактерий на полимерном матриксе из нанонитей поливинилпирролидона (PVP, $(C_6H_{12}NO)_n$) [3], названного методом «мягкой» иммобилизации. PVP был выбран в связи с его высокой биосовместимостью, способностью к растворению в воде и этиловом спирте [4], а также из-за многочисленных примеров его применения в различных биомедицинских целях [5].

Нити PVP синтезируются методом электроспиннинга — образование нанонитей из капель раствора-прекурсора в высоковольтном электростатическом поле [6]. Нити собираются на коллекторе из алюминиевой фольги, образуя полимерный матрикс. Параметры раствора и процесса электроспиннинга подбираются таким образом, чтобы размеры ячеек между нитями PVP были соотносимы с размерами иммобилизируемых бактерий. Например, для используемых в данном исследовании лактобактерий *Lactobacillus brevis* (*L. brevis*), *Lactobacillus acidophilus* подходят размеры ячеек 1–4 μm [7].

Используемый золь-гель метод позволяет легировать нити PVP солями металлов, придавая получаемым препаратам дополнительные свойства. Например, адаптогенная пищевая добавка, содержащая ионы железа, кроме профилактики инфекционных заболеваний обеспечит профилактику и лечение анемии.

Целью наших исследований является разработка методики синтеза нанонитей PVP с размерами пор между ними заданных размеров (1–4 μm), легированных солями железа с концентрациями от 0.5 до 6 at. %, для дальнейшего исследования влияния этих добавок на свойства адаптогенного препарата.

* Исследования проведены в рамках реализации Программы поддержки НИОКР студентов, аспирантов и лиц, имеющих ученую степень, финансируемой Правительством Республики Карелия.

© О. Я. Березина, П. И. Ерохова, А. А. Широкая, П. О. Ляшков, 2024

Для легирования нитей PVP ионами железа использовался нонагидрат нитрата железа (III) $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$. Во-первых, данное вещество растворимо и в воде, и в этаноле. Во-вторых, при смешении девятиводного нитрата железа (III) и воды / водного раствора этанола не выпадает осадок, значит, возможен стабильный синтез. И в-третьих, нитрат железа (III) не токсичен и может быть применен в качестве биологической добавки.

В результате получены образцы нанонитей с требуемым содержанием ионов железа (0.5; 2.4; 3 и 6 at.%.) и необходимыми для иммобилизации лактобактерий размерами пор между нитями (2–4 μm). На данный момент производится разработка методик синтеза нанонитей поливинилпирролидона, легированных ионами кобальта и марганца. Предполагается, что проводимые исследования приведут к получению нового высокоэффективного адаптогенного препарата.

Литература

1. Корочинский А. В., Верниковский В. В., Степанова Э. Ф. Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // Успехи современного естествознания. 2010. № 5. С. 34–38.

2. Римарчук Г. В., Урсова Н. И., Щеплягина Л. А. и др. Энтеросорбция в терапевтических программах различных заболеваний у детей // Альманах клинической медицины. 1999. Т. 2. С. 283–292.

3. Sidorova N., Berezina O., Markova N. et al. The effect of polyvinylpyrrolidone nanowires on the metabolic activity of Lactobacillus acidophilus // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 2019. Vol. 525. P. 125–131.

4. Бюлер Ф. Поливинилпирролидон для фармацевтической промышленности // Янтарный Сказ. 2003. С. 310.

5. Коломоец А. С. Нанокомпозиты хитозана, поливинилпирролидона с нанончастицами серебра // World of science: Материалы III Международной научно-практической конференции. Пенза: Наука и Просвещение, 2023. С. 15.

6. Березина О. Я., Маркова Н. П., Семенов А. В., Сидорова Н. А. Возможности использования нанонитей на основе поливинилпирролидона для иммобилизации клеток Lactobacillusacidophilus // Известия вузов: прикладная химия и биотехнология. 2018. Т. 8, № 5. С. 69–76.

7. Красникова Л. В., Гунькова П. И., Савкина О. А. Общая и пищевая микробиология. СПб., 2016.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-136

ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОМИТИГАТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА MYOTIVE *

STUDY OF RADIOMITIGATOR PROPERTIES OF MYOTIVE

А. С. Быков[1,2], С. Г. Молчанов[2], А. Е. Егоров[1], С. Н. Корякин[3],
Е. В. Аршинцева[4], С. Ю. Пушкин[4], П. О. Теплова[5], М. А. Тимченко[1]

[1]*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*
[2]*Томский государственный университет*
[3]*Обнинский институт атомной энергетики — филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ»*
[4]*ООО «Эмульсии медицинские», Серпухов*
[5]*Институт биофизики клетки РАН, Пущино*

A. S. Bykov[1,2], S. G. Molchanov[2], A. Y. Yegorov[1], S. N. Koryakin[3],
E. V. Arshintseva[4], S. Y. Pushkin[4], P. O. Teplova[5], M. A. Timchenko[1]

[1]*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino*
[2]*Tomsk State University*
[3]*Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering — Branch of National Research Nuclear University MEPhI*
[4]*Emulsions Medical LLC, Serpukhov*
[5]*Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino*

✉ perehc1@gmail.com

Аннотация

Известно, что ядерно-магнитная резонансная спектроскопия (ЯМР-спектроскопия) может эффективно применяться для установления метаболических изменений в крови и моче, вызванные частичным и полным облучением тела [1]. Целью нашей работы явилось изучение изменений в составе метаболитов эритроцитов методом ЯМР-спектроскопии после введения препарата MYOTIVE крысам, облученным γ-излучением в дозе, соответствующей ЛД 50/30, и оценка радиомитигаторных свойств препарата.

Abstract

It is known that NMR spectroscopy can be effectively used to detect metabolic changes in the blood and urine caused by partial and total body irradiation [1]. The purpose of our work was to study changes in the composition of metabolites of erythrocytes by NMR spectroscopy after administration of the drug MYOTIVE to rats irradiated with γ-radiation at a dose corresponding to LD 50/30, and to evaluate the radiomitigating properties of the drug.

Применение ЯМР-спектроскопии для исследования изменений в метаболизме при облучении может быть крайне полезным для понимания, какие процесс в первую очередь затрагиваются при облучении клеток и организма в целом, что дает возможность разработать стратегии лечения и защиты от радиации [2].

Воздействие ионизирующего излучения на организм, в том числе и при радиотерапии, может быть одной из причин нарушений в работе костного мозга. Защитой от такого воздействия может служить введение после облучения препаратов, обладающих радиомитигаторными свойствами. В этом качестве может выступать препарат MYOTIVE, для которого ранее показана дозозависимая тенденция к эритропоэзу и выявлен рост количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита. Для изучения действия препарата как радиомитигатора нами исследован метаболитный состав эритроцитов и плазмы крови крыс, которым после облучения вводили MYOTIVE, и проведено сравнение с контрольной группой животных и облученными животными. Основным методом оценки служил метод ЯМР-спектроскопии, который позволяет обнаруживать изменения метаболитов с высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет оценить изменения, происходящие при облучении и эффективность действия препаратов для защиты от радиационного воздействия.

В исследовании использовались три группы крыс: контрольная, облученная γ-излучением в дозе, соответствующей ЛД 50/30, и экспериментальная, которым после облучения вводили препарат MYOTIVE. Первый

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 075-00224-24-00 (ИТЭБ РАН).

© А. С. Быков, С. Г. Молчанов, А. Е. Егоров, С. Н. Корякин, Е. В. Аршинцева, С. Ю. Пушкин, П. О. Теплова, М. А. Тимченко, 2024

отбор крови проходил до облучения (фоновый день), второй — через неделю после облучения, третий — через две недели после облучения. Кровь забиралась из хвостовой вены.

Методом 31P ЯМР-спектроскопии получены спектры для эритроцитов. Они анализировались с помощью одномерного и многомерного статистического анализа, а также с использованием библиотеки metabom8 [3]. Анализ по методу Манна — Уитни и с помощью ROC-кривых полученных данных по фосфорным метаболитам и уровню гемоглобина показал, что после облучения и введения препарата через неделю и две недели достоверное отличие от здоровых выявлено только у группы облученных животных. Крысы с введенным MYOTIVE через неделю не отличались от контрольных по исследуемым параметрам, однако после двух недель после облучения, в отличие от контроля, у них повышался 2,3-дифосфоглицерат и понижался гемоглобин. Тем не менее уровни глюкозо-6-фосфата и АТФ поддерживались на уровне здоровых животных. Вероятно, в такой концентрации MYOTIVE или ввиду однократного введения этой концентрации препарата недостаточно для полного восстановления функционирования эритроцитов, хотя наблюдается положительная динамика. Данные подтверждались результатами гистологии костного мозга.

Таким образом, MYOTIVE позволяет восстанавливать уровень ряда метаболитов, участвующих в поддержании функции эритроцитов, до уровня здоровых животных, что дает возможность рассматривать его в качестве потенциального радиомитигатора.

Литература

1. Maan K., Tyagi R., Dutta A. et al. Comparative met-abolic profiles of total and partial body radiation exposure in mice using an untargeted metabolomics approach // Metabolomics. 2020, Vol. 16. P. 124.

2. Sersa I., Kranjc S., Sersa G. et al. Study of radiation induced changes of phosphorus metabolism in mice by (31)P NMR spectroscopy // Radiol Oncol. 2010. V Vol. 44. P. 174–179.

3. Tkimhofer T., metabom8 (Version 1.0.0) [Computer software], (2021). URL: https://github.com/tkimhofer/metabom8.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-137

ВОЗМОЖНОСТЬ ФОТОКОНТРОЛЯ ПРОТОН-АКТИВИРУЕМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ*

THE POSSIBILITY OF PHOTOCONTROL OF ACID-SENSING ION CHANNELS

Э. Д. Гатаулина, М. В. Николаев

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

E. D. Gataulina, M. V. Nikolaev

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ maileen2013@yandex.ru

Аннотация

В работе исследовано действие азобензол-содержащего производного спермина на протон-активируемые ионные каналы ASIC1a. Вещество оказывало угнетающее действие на каналы в условиях комнатного освещения, облучение синим светом восстанавливало токи через ASIC1a. Таким образом, обнаружена принципиальная возможность контроля ASIC1a с помощью фотохромных лигандов. Это открывает новые перспективы для разработки оригинальных светоуправляемых инструментов.

Abstract

In this work, we investigated the effect of an azobenzene-containing polyamine on the acid-sensing ion channel (ASIC1a). The compound inhibited the ion channels under room light condition, but irradiation with blue light restored currents. Thus, we have discovered the possibility to control ASIC1a using photochromic ligands. This finding is of great importance for the development of new light-controlled tools to study the role of these channels in the CNS.

Протон-активируемые ионные каналы (ASICs) представляют собой Na^+ ионные каналы, которые широко представлены в центральной и периферической нервной системе. Существует четыре гена, кодирующие, как минимум, шесть разных субъединиц, которые образуют гомо- и гетеротримерные комплексы. Активация ASICs происходит при восприятии боли, различных нейродегенеративных процессах, эпилепсии, ишемии. Появляется все больше доказательств того, что ASICs участвуют в синаптической передаче и пластичности, формировании памяти и обучении [1, 2]. Поэтому разработка фармакологических инструментов для изучения ASICs — важная проблема нейрофизиологии.

Перспективным направлением в изучении ионных каналов выступает использование фотохромных лигандов. Фотофармакология данных каналов только начинает свое развитие, но на сегодняшний день существуют блестящие примеры использования фотохромных лигандов для контроля различных ионных каналов с высочайшей пространственной и временной точностью. Данные лиганды для ASICs в настоящее время не описаны. Единственный пример фотохромной модуляции ASICs требует генетических модификаций белка [3].

Ранее было показано, что природный полиамин спермин при внеклеточной подаче оказывает модулирующее влияние на ASIC1a в экспериментах на изолированных культурах *ex vivo* и в моделях ишемии *in vivo* [4]. Мы разработали производное спермина, обладающее свойством фотоизомеризации. Цель данной работы состояла в экспериментальной проверке возможности фотоконтроля ASIC1a с помощью азобензол-содержащих производных спермина.

Эксперименты проводили на гомомерных каналах ASIC1a, экспрессированных в клетках линии CHO-K1. Токи через каналы регистрировали методом patch-clamp в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации напряжения. Рецепторы активировали подачей внеклеточного закисленного раствора. Оптический контроль осуществляли монохроматическим светом (лазер 450 нм). Оценивали изменение ответа ASIC1a в присутствии вещества в темноте (вытянутое транс-конформация) и при облучении светом (свернутое цис-состояние). Тестовая концентрация составила 30 μM.

При подаче соединения в омывающий раствор амплитуда ответов ASIC1a падала примерно в 2 раза по сравнению с контролем (52 ± 16 %, $n = 6$). Свет волны длиной 450 нм, который индуцирует транс-цис переход для данного соединения, практически полностью восстанавливал амплитуду ответа, угнетение снижалось до 10 ± 5 %, $n = 6$ относительно контроля.

* Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

© Э. Д. Гатаулина, М. В. Николаев, 2024

Варьирование мембранного потенциала не приводило к существенным изменениям действия азобензол-содержащего производного спермина, поэтому оно не является каналоблокатором. Активность соединения также не зависела от величины активирующего pH — вещество не изменяло чувствительность каналов к протонам. Однако стоит отметить, что светозависимость угнетения слабо, но статистически достоверно уменьшалась при активации каналов растворами с наиболее сильным закислением (pH = 4,5). Молекулярные механизмы угнетающего действия соединения неизвестны и требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, азобензол-содержащее производное спермина эффективно угнетает ASIC1a в условиях комнатного освещения в вытянутом транс-состоянии и теряет свою активность при облучении светом, переходя в свернутое цис-состояние. Активность соединения относительно невысока, чтобы рассматривать его как готовый инструмент для исследования. Тем не менее это первый уникальным пример контроля протон-активируемых ионных каналов свободно-диффундирующим фотохромным соединением, что позволяет в дальнейшем развивать фотофармакологию этих каналов. В настоящее время ведется поиск более активных соединений с выраженным эффектом фотопереключения. Учитывая, что во многом роль ASICs в физиологии ЦНС не ясна, такие разработки могут быть особенно интересны.

Литература

1. Sivils A., Yang F., Wang J. Q., Chu X. P. Acid-Sensing Ion Channel 2: Function and Modulation // Membranes (Basel). 2022. Vol. 12 (2). P. 113.

2. Storozhuk M., Cherninskyi A., Maximyuk O., Isaev D., Krishtal O. Acid-Sensing Ion Channels: Focus on Physiological and Some Pathological Roles in the Brain // Current Neuropharmacology. 2021 Vol. 19 (9). P. 1570–1589.

3. Browne L. E., Nunes J. P., Sim J. A. et al. Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014. Vol. 111 (1). P. 521–526.

Duan B., Wang Y. Z., Yang T. et al. Extracellular spermine exacerbates ischemic neuronal injury through sensitization of ASIC1a channels to extracellular acidosis // The Journal of Neuroscience. 2011. Vol. 9, № 31 (6). P. 2101–2112.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-138

ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ SKOV-3 В БЕСКЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСАХ ОРГАНОВ МЫШИ С РАЗЛИЧНЫМИ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ *

STUDY OF GROWTH OF HUMAN OVARIAN ADENOCARCINOMA CELLS LINE SKOV-3 IN ACELLULAR MATRICES OF MOUSE ORGANS WITH DIFFERENT STRUCTURAL AND MECHANICAL CHARACTERISTICS

С. Д. Гефтер[1], А. Д. Поспелов[1], Д. Б. Трушина[2,3], Ю. М. Ефремов[2], М. Ю. Карпушин[1], И. В. Балалаева[1]

[1]Нижегородский национальный исследовательский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России
[3]Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва

S. D. Gefter[1], A. D. Pospelov[1], D. B. Trushina[2,3], Yu. M. Efremov[2], M. Yu. Karpushin[1], I. V. Balalaeva[1]

[1]Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
[2]Sechenov First Moscow State Medical University
[3]Federal Research Center "Crystallography and Photonics" RAS, Moscow

✉ sofia.gieftier.00@mail.ru

Аннотация

В работе проанализированы особенности роста клеток аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3 в бесклеточных матриксах органов мыши. Показано, что способность опухолевых клеток к заселению ткани зависит от структурно-механических параметров матрикса. В частности, наибольший рост клеток наблюдался в матриксах с низкой жесткостью трехмерной структуры и большим размером пор.

Abstract

The paper analyzes the growth characteristics of human ovarian adenocarcinoma cells of the SKOV-3 line in cell-free matrices of mouse organs. It is shown that the ability of tumor cells to populate tissue depends on the structural and mechanical parameters of the matrix. In particular, the greatest cell growth was observed in matrices with low stiffness of the three-dimensional structure and large pore size.

Микроокружение опухоли играет важную роль в ее развитии и прогрессировании. Одним из основных компонентов опухолевого микроокружения является внеклеточный матрикс (ВКМ), интерес к которому все больше возрастает со стороны фундаментальной и прикладной онкологии. Исследования влияния структурно-механических свойств ВКМ на рост и развитие опухолевых клеток в настоящее время получили активное развитие. Существует мнение, что наиболее важными физическими факторами, влияющими на прогрессирование опухоли, являются жесткость и размер пор [1]. Изучить клеточно-матриксные взаимодействия в условиях *in vitro* позволяют трехмерные модели опухолевого роста на основе децеллюляризированных (ДЦЛ) тканей.

Цель работы — исследование роста клеток аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3 в бесклеточных матриксах органов мыши, различающихся по своим структурно-механическим свойствам.

ВКМ получали из органов лабораторных мышей линии Balb/C согласно разработанному ранее протоколу децеллюляризации [2]. Фрагменты органов (легкое, печень, почка, селезенка) объемом не более 50 мм^3 инкубировали в трех детергентах различных концентраций (0,5 % Triton X-100, 0,5 % SDS и 1 % SDC и 0,075 % SDS) для удаления нативных клеток из ткани. Качество полученных матриксов оценивали стандартным гистоморфологическим анализом; структурные параметры, такие как размеры пор и диаметр волокон ДЦЛ матриксов, анализировали при помощи сканирующей электронной микроскопии (Hitachi™ 4000Plus); общую жесткость трехмерной структуры матриксов измеряли методом макроиндентации, принцип которой основан на оказании давления с заданной нагрузкой на образец (Mach-1™ v500csst); локальную жесткость матриксов на уровне индивидуальных волокон измеряли методом атомно-силовой микроскопии (BioScope Resolve microscope). Для заселения матриксов опухолевыми клетками использовали линию аденокарциномы яичника человека SKOV-3. Клетки в количестве

* Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (код проекта FSWR2023-0032).
© С. Д. Гефтер, А. Д. Поспелов, Д. Б. Трушина, Ю. М. Ефремов, М. Ю. Карпушин, И. В. Балалаева, 2024

3×10^5 клеток в 200 мкл полной ростовой среды вкалывали шприцом в каждый ДЦЛ матрикс. Подсчет количества клеток и анализ их морфотипа проводили через 7 дней с помощью стандартного гистологического исследования.

По результатам работы получены бесклеточные органные ДЦЛ матриксы, характеризующиеся структурной целостностью и демонстрирующие полную клеточную элиминацию. Выявлено, что каждый из полученных матриксов характеризуется специфичным набором значений параметров, таких как площадь пор и диаметр фибрилл, общая жесткость трехмерной структуры и на уровне отдельных волокон. Таким образом, можно сделать заключение об уникальности структурно-механических свойств органных матриксов различного происхождения.

По результатам гистологического анализа все матриксы заселены опухолевыми клетками (рис. 1), однако характер заселения отличался для матриксов разных органов.

Наибольшая степень заселения показана для ДЦЛ матрикса тканей легких; клетки мезенхимальной морфологии наблюдались по всему пространству матрикса. В матриксе печени клетки обнаруживались в соединительной ткани печеночной триады, формируя хорошо выраженный кластер. При рецеллюляризации почек было обнаружено большое количество сильно диссеминированных по корковому веществу клеток. Инвазивность клеток в ДЦЛ матрикс тканей селезенки очень низкая, клетки обнаруживались по внешнему периметру капсулы с единичной локальной миграцией внутрь.

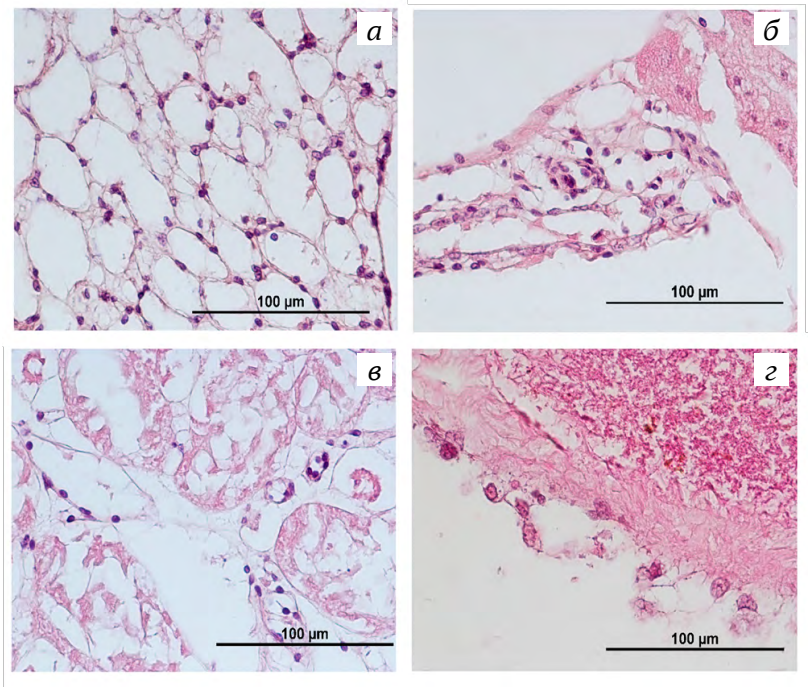


Рис. 1. Микрофотографии органных ДЦЛ матриксов после репопуляризации опухолевыми клетками (окрашивание H&E): *а* — легкого; *б* — печени; *в* — почек; *г* — селезенки

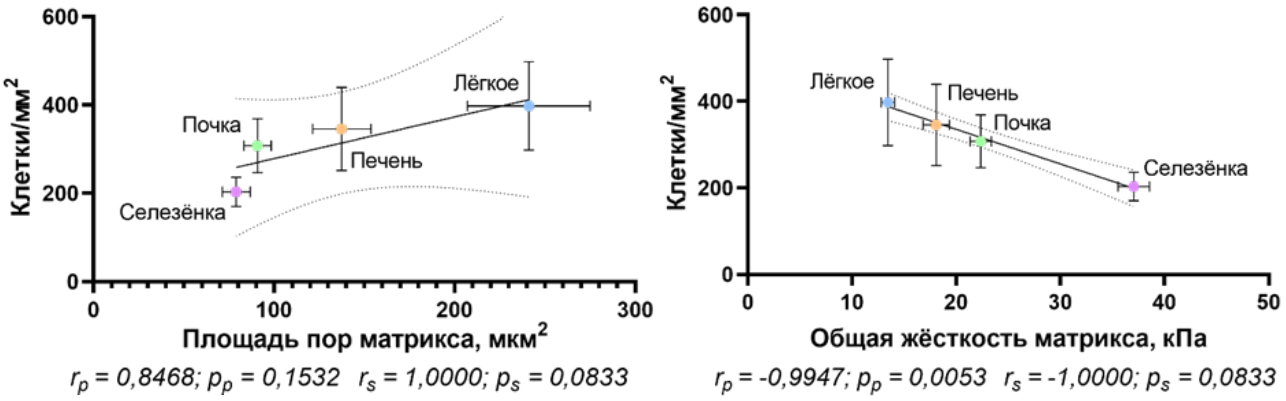


Рис. 2. Анализ корреляции между структурно-механическими параметрами матрикса и ростом клеток аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3. Для всех сравнений указан коэффициент корреляции Пирсона (r_p) и Спирмена (r_s) с соответствующими уровнями значимости (p_p и p_s)

Для проверки влияния структурно-механических свойств ДЦЛ матриксов на клетки проведен корреляционный анализ. Мы выявили выраженную тенденцию к прямой связи между заселенностью ДЦЛ матрикса клетками аденокарциномы и размерами матриксных пор ($r_s = 1{,}0$, $p_s < 0{,}1$) и выраженную обратную корреляцию между уровнем заселенности матрикса и его общей жесткостью трехмерной структуры ($r_p \approx -0{,}99$, $p_p < 0{,}05$) (рис. 2). Можно предположить, что низкая общая жесткость внеклеточного матрикса и большой размер пор являются факторами, влияющими на высокую пролиферативную и инвазивную активность клеток аденокарциномы яичника человека линии SKOV-3.

Полученные результаты согласуются с закономерностями, показанными ранее для опухолевых клеток другого происхождения [2]. Обнаруженные корреляции паттернов клеточного роста со структурно-механическими параметрами матрикса позволяют предположить наличие универсальных закономерностей клеточно-матриксных взаимодействий для клеток разного происхождения со сходным мезенхимальным фенотипом.

Литература

1. Tien J., Ghani U., Dance Y. W. et al. Matrix Pore Size Governs Escape of Human Breast Cancer Cells from a Microtumor to an Empty Cavity // iScience. 2020. Vol. 23 (11).

2. Pospelov A. D., Kutova O. M., Efremov Y. M. et al. Breast Cancer Cell Type and Biomechanical Properties of Decellularized Mouse Organs Drives Tumor Cell Colonization // Cells. 2023. Vol. 12 (16).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-139

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМЫ ОКСИДАТИВНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАДИКАЛЬНЫХ ИНИЦИАТОРОВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ *

KITETICS AND MECHANISMS OF OXIDATIVE HEMOLYSIS OF ERYTHROCYTES UNDER THE INFLUENCE OF RADICAL INITIATORS OF LIPID PEROXIDATION

Н. А. Дубенская[2], Е. М. Соколова[1],
Б. Л. Психа[1], Н. И. Нешев[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

N. A. Dubenskaia[2], E. M. Sokolova[1],
B. L. Psikha[1], N. I. Neshev[1]

[1] *Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry RAS, Chernogolovka*
[2] *Lomonosov Moscow State University*

✉ nina2606nina@yandex.ru

Аннотация

В широком диапазоне концентраций изучена кинетика оксидативного гемолиза 0,2%-й суспензии эритроцитов мыши под действием радикалообразующих инициаторов пероксидной природы: гидропероксида кумола (Cumyl-OOH), пероксида водорода (HP), *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BuOOH) и 2,2'-азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорид (AAPH), относящегося к классу диазосоединений.

Abstract

The kinetics of oxidative hemolysis of a 0.2 % suspension of mouse erythrocytes under the influence of radical-forming initiators of a peroxide nature: cumene hydroperoxide (Cumyl-OOH), hydrogen peroxide (HP), tert-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) and 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), belonging to the diazo compounds family.

Поиск и исследование веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, а также последующая разработка на их основе фармакологических препаратов — по-прежнему базовые направления химической биологии и медицинской химии. Это обусловливает актуальность и практическую значимость разработки биологических моделей, на которых осуществляется тестирование новых соединений на антиоксидантную активность. Широко используются для этой цели модели индуцированного оксидативного гемолиза эритроцитов. В качестве его индукторов выступают известные в химии полимеры азо- и пероксидные инициаторы радикальной полимеризации.

Нами изучена кинетика оксидативного гемолиза 0,2%-й суспензии эритроцитов мыши под действием 2,2´-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (AAPH), пероксида водорода (HP), *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BuOOH), гидропероксида кумола (Cumyl-OOH). Гемолитическую активность инициаторов характеризовали длительностью периода индукции гемолиза.

В то же время кинетические закономерности гемолиза под действием исследуемых соединений существенно различались. В случае AAPH величина периода индукции гемолиза убывала обратно пропорционально квадратному корню от концентрации инициатора, что согласуется с классической теорией радикально-цепного окисления углеводородов. В случае *t*-BuOOH период индукции гемолиза убывал медленнее, проявляя тенденцию к насыщению. Данная зависимость хорошо аппроксимировалась биэкспоненциальной функцией вида $y = A_1 e^{-k_1 C} + A_2 e^{k_2 C} + y_0$, где k_1 и k_2 равны $2 \cdot 10^{-2}$ и $65 \cdot 10^{-2}$ соответственно. Это может указывать на возможное присутствие двух различных факторов, влияющих на исследуемую систему.

HP и Cumyl-OOH вызывали гемолитические эффекты примерно в том же диапазоне концентраций, что и *t*-BuOOH, однако сквозную концентрационную зависимость в этом случае получить не удается.

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 12402500019-2.

© Н. А. Дубенская, Е. М. Соколова, Б. Л. Психа, Н. И. Нешев, 2024

Полученные в работе результаты согласуются с представлением, что в случае с ААРН основной радикальной формой является образующийся при разложении ААРН в водной среде пероксидный радикал, который атакует мембрану клетки снаружи. В то же время под действием пероксидов оксидативные процессы вначале инициируются внутри клетки с участием гемоглобина, после чего первичные радикальные формы атакуют мембрану изнутри, что в целом делает систему более сложной. Следовательно, в эритроцитарной модели индуцированного оксидативного гемолиза эритроцитов в качестве инициатора перекисного окисления липидов предпочтительнее использовать азогенератор пероксидных радикалов — ААРН.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-140

КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЕ В КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДАХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ЗАМОРОЗКИ *

ICE CRYSTAL FORMATION IN CRYOPROTECTIVE MEDIA UNDER VARIOUS FREEZING REGIMES

А. А. Иванова, Е. Ю. Симоненко

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

A. A. Ivanova, E. U. Simonenko

Lomonosov Moscow State University

✉ Annetkurella@yandex.ru

Аннотация

Несмотря на многочисленные исследования процесса криоконсервации процент выживаемости клеток остается низким. Работа посвящена исследованию процесса кристаллообразования в криопротекторных средах при различных режимах заморозки. Предложен новый метод анализа дифракционных картин, а также альтернативный режим заморозки клеток при криоконсервации.

Abstract

Despite numerous studied of the cryopreservation process the percentage of cell survival remais low. The work is devoted to the study of the process of ice crystal formation in cryoprotective media under various freezing regimes. A new method for diffraction patterns analysis as well as alternative mode of cell freezing regime during cryopreservation is proposed.

Одним из перспективных направлений современной медицины является криоконсервация биологического материала: плазмы крови, гамет, эмбрионов и т. д. — ключевая среди вспомогательных репродуктивных технологий. Несмотря на то, что методы криоконсервации постоянно совершенствуются, при замораживании в больших объемах потери клеток могут составлять 40–60 % [1]. Для снижения негативных воздействий данного процесса используются криопротекторные среды [2]. Для заморозки сперматозоидов чаще всего используется комбинация проникающих (глицерин в концентрации от 10 до 15 % по объему) и непроникающих (сахароза — 0,05–0,5 М, альбумин — 4 мг/мл) компонентов [3].

В научных источниках нет подробного изучения процесса кристаллообразования в водных растворах глицерина низкой концентрации при различных режимах заморозки. Поэтому целью нашей работы является изучение процесса формирования кристаллов льда в криопротекторных средах на основе водных растворов глицерина низкой концентрации при различных режимах заморозки.

Оценка средних размеров кристаллов, формирующихся в изучаемых растворах при различных режимах заморозки, проведены с помощью рентгеноструктурного анализа (PETRA III, DESY, Германия). Первые эксперименты осуществлялись для базовых растворов малых объемов (20 мкл). Полученные результаты продемонстрировали возможность использования данного метода с целью изучения процесса кристаллообразования. Для получения значений средних размеров кристаллов, формирующихся в растворе при криоконсервации, написано программное обеспечение, позволяющее численно оценить размеры данных кристаллов. С помощью этой программы показано, что для буферного раствора глицерина с добавлением непроникающих компонентов (альбумина — 4 мг/мл, сахарозы — 0,04 М), который является аналогом коммерческих криопротекторных сред, используемых в клиниках вспомогательных репродуктивных технологий, средний размер кристаллов, формирующихся в растворе, составляет 9 ± 1 мкм.

В ходе экспериментов обнаружено, что при классической вертикальной заморозке кристаллообразование происходит неоднородно. В связи с этим предложен альтернативный метод горизонтальной трехуровневой заморозки, для его реализации разработан и напечатан на 3D-принтере держатель для пробирок. Процесс формирования кристаллов при горизонтальной заморозке происходит более однородно, что подтверждается статистическим

* Работа выполнена в рамках проекта 23-Ш01-15 междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М. В. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования космоса».

© А. А. Иванова, Е. Ю. Симоненко, 2024

анализом отличия средних размеров кристаллов внутри одной криопробирки для всех исследуемых растворов при классическом вертикальном и альтернативном протоколе заморозки ($p = 0,05$). В ходе экспериментов также установлено, что для коммерческого криопротектора SpermFreeze средний размер кристаллов при вертикальной заморозке составляет 13 ± 1 мкм в верхней части пробирки и 8 ± 2 мкм в нижней, при горизонтальном режиме заморозки — 9 ± 1 мкм в верхней части пробирки и 8 ± 1 мкм в нижней.

Таким образом, в ходе проведенной работы разработан новый метод анализа дифракционных картин для криопротекторных сред, позволяющий получить значения средний размеров формирующихся кристаллов льда. Обнаружено неоднородное формирование кристаллов льда в криопробирках при классическом вертикальном протоколе заморозке. На основании полученных результатов предложен альтернативный горизонтальный режим заморозки при криоконсервации, который статистически значимо приводит к более однородному формированию кристаллов меньшими средними размерами при заморозке.

Литература

1. Petrunkina A. M. Fundamental Aspects of Gamete Cryobiology // Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology. 2007. Vol. 4 (2). P. 78–91.

2. Mazur P., Leibo S. P., Chu E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury // Experimental Cell Research. 1972. Vol. 71. P. 345–355.

3. Libo S. P., Picton H. M. and Godson R. G. Current Practices and Controversis in Assisted Reproduction / World Health Organization. Geneva, 2001. P. 152–165.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-141

СОЗДАНИЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО СКРИНИНГА КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ *

DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR TARGETED ANTIMICROBIAL PEPTIDE COMPOUNDS COMBINATORIAL LIBRARIES SCREENING

А. И. Калганова[1], С. О. Пипия[1], И. В. Смирнов[1,2], С. С. Терехов[1]

[1] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

A. I. Kalganova[1], S. O. Pipiya[1], I. V. Smirnov[1,2], S. S. Terekhov[1]

[1] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*

✉ kalganovanas@ibch.ru

Аннотация

Антибиотикорезистентность является серьезной проблемой современного здравоохранения. На данный момент существует ограниченное число платформ для поиска новых антимикробных препаратов, активных в отношении бактерий с резистентностью к антибиотикам. Разрабатываемая технология позволит проводить скрининг высокопредставительных библиотек измененных природных соединений, что дает возможность усилить их эффективность и / или расширить спектр активности.

Abstract

Antibiotic resistance is a serious problem in modern healthcare. Currently, there are a limited number of platforms for development of new antimicrobial drugs active against antibiotic-resistant bacterial strains The technology will make it possible to screen entire libraries of modified natural compounds, which will enhance their effectiveness and / or expand their spectrum of activity.

Исследование сосредоточено на разработке скрининг-платформы для поиска соединений активных в отношении социально значимых ESKAPE-патогенов. Рассматриваемые соединения представляют собой отдельные варианты из комбинаторной библиотеки ДНК-кодируемых антимикробных веществ. Платформа позволит отбирать молекулы-кандидаты с различными механизмами действий, а также осуществлять направленную селекцию активных вариантов при изменении условий культивирования бактериальных возбудителей на разных раундах отбора. Одним из направлений работы является обеспечение возможности обнаружения адъювантной активности нескольких соединений. Уникальность разрабатываемой технологии заключается в том числе в том, что она позволит осуществлять поиск соединений, потенциирующих действие антимикробных пептидов для преодоления антибиотикорезистентности устойчивых микроорганизмов.

Под пептидными матрицами подразумевается широкое разнообразие антимикробных пептидов (АМП) с измененной последовательностью. Использование природных АМП в качестве исходной матрицы для последующих модификаций не ново, однако получение комбинаторных библиотек с прямым отбором против ESCAPE-бактериальных патогенов показано не было. На основе полученных ранее данных об эффективности природных антимикробных соединений выбраны пептидные матрицы для создания библиотек искусственного разнообразия АМП с помощью методов рационального дизайна.

В данной работе АМП нарабатываются путем гетерологической экспрессии в дрожжевых клетках. Недавняя публикация лаборатории продемонстрировала возможность использования в качестве продуцента антимикробных соединений дрожжей *Pichia pastoris* [1–3]. Использование рекомбинантных продуцентов АМП позволяет анализировать до 10^6 вариантов соединений в ходе одного раунда скрининга.

Важной частью работы является этап оптимизации условий формирования стабильных эмульсий и последующего культивирования клеток. Возможность инкапсуляции и скрининга не отдельных штаммов, а целой микробиоты с использованием капельной микрофлюидики для функционального профилирования была показана нашей лабораторией ранее [4, 5].

* Работа выполняется при поддержке Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2024-536).

© А. И. Калганова, С. О. Пипия, И. В. Смирнов, С. С. Терехов, 2024

Мы используем два подхода. Первый заключается в кокультивации дрожжевых клеток-продуцентов АМП и бактерий-мишеней, конститутивно-продуцирующих флуоресцентный белок внутри двойной эмульсии. В качестве аналитического сигнала используется флуоресценция живых бактериальных клеток. Во втором методе также производится кокультивация тех же клеток, но в формате однократной эмульсии по принципу витальной селекции. Активные кандидаты отбираются с помощью FACS или высева на селективную питательную среду для первого и второго подходов соответственно.

После анализа активности индивидуальных клеток выделяется геномная ДНК и затем секвенируется последовательность молекул-кандидатов, после вещество необходимо получить путем химического синтеза и протестировать его активность повторно.

С помощью платформы произведен скрининг разработанных комбинаторных библиотек и получено несколько молекул-кандидатов, проявляющих антимикробную активность в отношении ESKAPE-патогенов. Результаты демонстрируют перспективность использования данной платформы для эффективного отбора ДНК-кодируемых молекул.

Литература

1. Pipiya S. O., Mokrushina Y. A., Gabibov A. G. et al. Selective Eradication of Staphylococcus aureus by the Designer Genetically Programmed Yeast Biocontrol Agent // Antibiotics (Basel). 2020. Vol. 9 (9). P. 527.

2. Pipiya S. O., Kudzhaev A. M., Mirzoeva N. Z. et al. Bioengineering the Antimicrobial Activity of Yeast by Recombinant Thanatin Production // Antibiotics (Basel). 2023. Vol. 12 (12). P. 1719.

3. Pipiya S. O., Mirzoeva N. Z., Baranova M. N. et al. Creation of recombinant biocontrol agents by genetic programming of yeast // Acta Naturae. 2023. Vol. 15 (1). P. 74–80.

4. Terekhov S.S., Smirnov I. V., Stepanova A.V. et al. Microfluidic droplet platform for ultrahigh-throughput single-cell screening of biodiversity // Proceedings of the National Academy of Sciencesof the United States of America. 2017. Vol. 114 (10). P. 2550–2555.

5. Terekhov S. S., Smirnov I. V., Malakhova M. V. et al. Ultrahigh-throughput functional profiling of microbiota communities // Proceedings of the National Academy of Sciencesof the United States of America. 2018. Vol. 115 (38). P. 9551–9556.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-142

ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ САМООГРАНИЧЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ РНК К ДЕЙСТВИЮ ИСКУССТВЕННЫХ РИБОНУКЛЕАЗ*

RESEARCH OF THE SELF-LIMITED RNA COMPLEXES RESISTANCE TO THE ARTIFICIAL RIBONUCLEASES ACTION

М. А. Канарская, А. А. Ломзов

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

M. A. Kanarskaya, A. A. Lomzov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

✉ makanarskaya@gmail.com

Аннотация

Поиск подходов для изменения структуры комплексов нуклеиновых кислот является актуальной задачей. Исследована устойчивость самоограниченных комплексов ДНК / РНК, образованных парой олигонуклеотидов, к действию различных рибонуклеаз. Показано, что все изученные рибонуклеазы расщепляют комплексы разной молекулярности с различной скоростью и эффективностью. Изучена специфичность расщепления РНК: для РНКазы Н наблюдали специфичность деградации дуплексного участка, для искусственной рибонуклеазы — одноцепочечного.

Abstract

The search for approaches to change the nucleic acid complex structures is the actual task. The resistance of self-limited complexes DNA / RNA formed by a pair of oligonucleotides to the action of various ribonucleases has been studied. It has been shown that all the studied ribonucleases cleave complexes of different molecularity with different speeds and efficiencies. The specificity of RNA cleavage was studied: for RNase H, the specificity of degradation of the duplex site was observed, for artificial ribonuclease — single-stranded.

Одно из назначений вторичной структуры нуклеиновых кислот — регуляция разнообразных молекулярно-биологических функций в клетке. Ранее в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН были детально исследованы самоограниченные комплексы, сформированные парой ДНК / РНК олигонуклеотидов, которые имеют два попарно-комплементарных участка, соединенных гибким линкером. В данный момент важной задачей является поиск подходов для изменения структуры комплексов нуклеотидов. Один из таких подходов — применение рибонуклеаз (РНКаз), или ферментов, расщепляющих цепи РНК. Сегодня разрабатываются различные искусственные рибонуклеазы с заданными физико-химическими свойствами.

Целью работы является исследование устойчивости самоограниченных комплексов ДНК / РНК, образованных парой олигонуклеотидов, к действию различных рибонуклеаз.

Объектом исследования выступают ДНК и РНК олигонуклеотиды, состоящие из десяти нуклеотидных звеньев, соединенных нуклеотидным линкером различной длины. Ранее было выявлено, как длина линкеров влияет на тип сформированного комплекса. Выбраны олигонуклеотиды, собирающиеся в самоограниченные комплексы разной молекулярности. В качестве рибонуклеаз взяты имидазол, искусственная РНКаза трис-(2-аминобензимидазол), содержащая несколько остатков имидазола, и РНКаза Н. Анализ скорости и эффективности расщепления РНК проведен методом гель-электрофореза.

Анализ результатов взаимодействия комплексов с имидазолом показал, что расщепление цепей РНК происходит с различной скоростью и эффективностью. Не обнаружена корреляция длины цепи РНК или типа комплекса ДНК / РНК и эффективности деградации. Также ожидалось увидеть специфичность к расщеплению одноцепочечного линкера, однако установлено, что деградация РНК происходит равномерно по всей длине цепи. Далее

* Работа выполнена в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121112900217-3 и проекта Министерства науки и высшего образования № 075-15-2022-263.

© М. А. Канарская, А. А. Ломзов, 2024

исследовано взаимодействие самоограниченных комплексов с искусственной РНКазой трис-(2-аминобензимидазол). Эффективность расщепления таким соединением РНК в комплексе значительно ниже, чем одноцепочечной РНК. Однако наблюдается специфичность расщепления по одноцепочечному линкеру РНК в составе комплекса. РНКаза Н расщепляет комплексы различной молекулярности с разной скоростью, происходит деградация связей между нуклеотидами в дуплексе.

Таким образом, РНК в самоограниченных комплексах эффективно расщепляется искусственными и природными рибонуклеазами. Рассмотренные модельные комплексы имеют высокий потенциал для применения в терапевтических целях.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-143

ВЛИЯНИЕ ОТЕКА КЛЕТОК НА ИЗМЕНЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ РАСПРОСТРАНЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ ВОЛНЫ В МОНОСЛОЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫСИНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ*

EFFECT OF CELLULAR EDEMA ON CALCIUM WAVE PROPAGATION IN A MONOLAYER OF NEONATAL RAT CARDIOMYOCYTES

Д. Г. Киселева[1,2], В. Д. Джабраилов[3], А. А. Аитова[3], Е. А. Турчанинова[3], В. А. Цвелая[3], Т. Ю. Плюснина[2], А. М. Маркин[1,4]

[1]*Российский научный центр хирургии им. Б. В. Петровского, Москва*
[2]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[4]*Российский университет дружбы народов, Москва*

D. G. Kiseleva[1,2], V. D. Dzhabrailov[3], A. A. Aitova[3], E. A. Turchaninova[3], V. A. Tsvelaya[3], T. Yu. Plyusnina[2], A. M. Markin[1,4]

[1]*Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow*
[2]*Lomonosov Moscow State University*
[3]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[4]*Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow*

✉ kiseleva.dg@gmail.com

Аннотация

В исследовании оценено влияние отеков клеток на кальциевую динамику монослоя кардиомиоцитов с помощью оптического картирования. Показано резкое снижение скорости распространения кальциевых волн при уменьшении осмоляльности раствора. Также продемонстрирован переход от нормального фронта к спиральной волне и множественным вейвлетам возбуждения, которые впервые были зарегистрированы на монослое клеток.

Abstract

We assessed the effect of cell edema on calcium dynamics in a cardiomyocyte monolayer with optical mapping. A sharp decrease in the calcium wave propagation speed was shown in hypoosmotic solutions. Moreover, we demonstrated transition from a normal wavefront to a spiral wave formation and multiple excitation wavelets, which were first recorded in a two-dimensional cellular model.

Отек миокарда является частым симптомом патологических процессов в сердечной мышце, а недавние исследования показывают, что ее отек не только самостоятельно вызывает ухудшение течения сердечно-сосудистых заболеваний, но и приводит к необратимому ремоделированию миокарда [1]. Также выявлено на базе данных пациентов, что отек миокарда выступает одним из механизмов, способствующим аритмическому фенотипу острого миокардита [2]. Кроме того, все больше клинических данных свидетельствуют о том, что острая фаза инфаркта характеризуется значительной отечностью миокарда в совокупности с высокой подверженностью пациентов к фибрилляциям желудочков [3, 4]. Потенциальные механизмы, вызывающие нарушение ритма сердца, связаны с различными нелинейными режимами распространения волны потенциала действия и кальциевой волны по функциональному синцитию.

Несмотря на высокую распространенность отека миокарда, в настоящий момент нет исследований, где отражено его влияние на кальциевую динамику в функциональном синцитии. В данной работе проведено оптическое картирование образцов монослоя неонатальных желудочковых кардиомиоцитов крыс с помощью флуоресцентного кальциевого красителя Fluo-4 флуоресцентным микроскопом Olympus MVX 10 с EMCCD-камерой Andor iXon3. Длительность импульса — 20 мс, частота — 0.8 Гц, 7 В. Всего обработано 91 видео. Отек клеток моделировали с помощью снижения осмоляльности растворов за счет содержания NaCl. Исходный раствор Тироде содержал 140 мМ NaCl (1T), а гипоосмотические растворы — 105 и 70 мМ NaCl (0.75 и 0.5T соответственно). Далее значения изменения скорости указаны в виде средних значения (стандартные отклонения).

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-75-10026).

© Д. Г. Киселева, В. Д. Джабраилов, А. А. Аитова, Е. А. Турчанинова, В. А. Цвелая, Т. Ю. Плюснина, А. М. Маркин, 2024

Данное исследование продемонстрировало резкое снижение скорости распространения кальциевых волн при уменьшении осмоляльности раствора. В растворе 0.75Т нормализованная скорость снизилась вдвое от исходной (1Т) — до 0.483 (0.078), а при 0.5Т — до 0.051 (0.012) и сокращения почти останавливались. При последовательном повышении осмоляльности раствора восстановление скорости до исходной не происходит спустя час инкубации в растворах 0.75 и 1Т, составив 0.262 (0.175) и 0.496 (0.117) соответственно, что говорит о высокой чувствительности кардиомиоцитов к изменению объема. Последовательное снижение осмоляльности также показало переход от нормального волнового фронта к возникновению нескольких динамических режимов: к спиральной волне при 0.75Т и фазовым сингулярностям в виде множественных вейвлетов (небольших волн) возбуждения с разрывами фронта при 0.5Т, которые впервые были зарегистрированы в данной работе на двумерном монослое кардиомиоцитов. Спиральные волны потенциально соответствуют тахиаритмиям, вызванным риентри [5], и достаточно хорошо изучены. В настоящий момент считается, что множественные вейвлеты возбуждения вызывают фибрилляции, которые являются наиболее опасным видом аритмий.

Оба типа режимов получены без дополнительного изменения протокола электростимуляции, который обычно используются для индуцирования аритмии *in vitro* и *ex vivo* за счет функциональной блокады проведения. Полученные в работе результаты соответствуют более нативному моделированию аритмий при органических изменениях миокарда, которые наиболее часто встречаются при сердечно-сосудистых заболеваниях.

Литература

1. Nielsen N. R., Rangarajan K. V., Mao L. et al. A murine model of increased coronary sinus pressure induces myocardial edema with cardiac lymphatic dilation and fibrosis // American Journal of Physiology — Heart and Circulatory Physiology. 2020. Vol. 318(4). P. H895–H907.

2. Kragholm K. H., Lindgren F. L., Zaremba T. et al. Mortality and ventricular arrhythmia after acute myocarditis: a nationwide registry-based follow-up study // Open Heart. 2021. Vol. 8(2): e001806.

3. Amano Y., Tachi M., Tani H et al. T2-weighted cardiac magnetic resonance imaging of edema in myocardial diseases // The Scientific World Journal. September 2012.

4. Sattler S. M., Skibsbye L., Linz D. et al. Ventricular arrhythmias in first acute myocardial infarction: Epidemiology, mechanisms, and interventions in large animal models // Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2019. Vol. 6.

5. Woo S.-J., Hong J. H., Kim T. Y., Wook Bae B., Lee K. J. Spiral wave drift and complex-oscillatory spiral waves caused by heterogeneities in two-dimensional in vitro cardiac tissues // New Journal of Physics. 2008. Vol. 10(1). P. 015005.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-144

АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ БЕТА-АДРЕНОСТИМУЛЯЦИИ

THE ACTIVITY OF VOLTAGE-GATED ION CHANNELS OF HUMAN CARDIOMYOCYTES UNDER BETA-ADRENERGIC STIMULATION

С. Г. Коваленко, Ш. Р. Фролова

Московский физико-технический институт, Долгопрудный
Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

S. G. Kovalenko, S. R. Frolova

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute

✉ sandaara.romanova@phystech.edu

Аннотация

Исследовано влияние изопреналина на потенциал-зависимые ионные каналы человеческих желудочковых кардиомиоцитов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от здорового донора. В результате методом пэтч-кламп получены количественные характеристики модуляции токов INa, ICa, *L* и IKs человеческих кардиомиоцитов при бета-адреностимуляции.

Abstract

The effect of isoprenaline on voltage-dependent ion channels of human ventricular cardiomyocytes differentiated from induced pluripotent stem cells from a healthy donor was studied. As a result, quantitative characteristics of the modulation of currents INa, ICa, *L* and IKs of human cardiomyocytes during beta-adrenergic stimulation were obtained using the patch-clamp method.

Стимуляция адренорецепторов (АР) приводит к увеличению частоты сокращений сердца, скорости проведения возбуждения и изменению силы мышечных сокращений, т. е. является компенсаторным механизмом, который временно поддерживает сердечный выброс. Тем не менее в случае патологий, таких, например, как сердечная недостаточность, адреностимуляция желудочков может привести к возникновению аритмий. Потенциально аритмогенными являются внутриклеточные механизмы при воздействии адреналином на ткань сердца. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в понимании роли передачи сигналов бета-адреностимуляции при заболеваниях сердца и аритмиях, количественное и функциональное понимание роли вегетативной стимуляции в нормальной электрофизиологии сердца и опасных для жизни аритмиях все еще не полно [1].

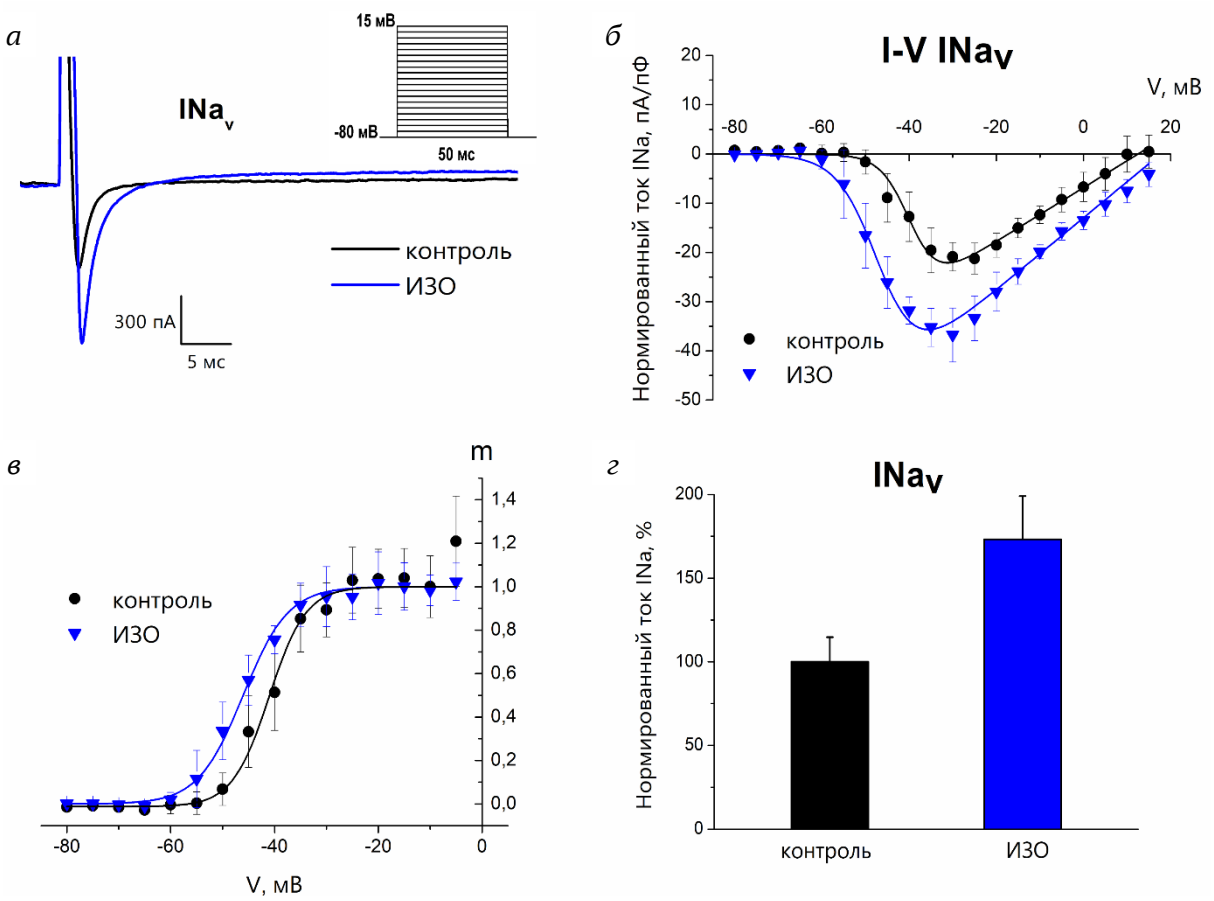
Изопреналин (изопротеренол) является чистым неселективным агонистом бета-адренорецепторов. Существует пробел в количественном понимании влияния бета-адреностимуляции на функцию ионных каналов сердца человека: симпатический эффект исследован главным образом на клеточных моделях животных, зачастую при комнатной температуре.

В данной работе в качестве человеческих кардиомиоцитов выбраны клетки, полученные путем дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) линии здорового человека m34sk3. Цель работы — исследовать модуляцию потенциал-зависимых ионных каналов (INa, ICa, *L* и IKs) человеческих кардиомиоцитов в условиях бета-адреностимуляции.

Регистрировали быстрый натриевый ток с помощью протокола стимуляции от –80 до +15 мВ с шагом в 5 мВ и длительностью 50 мс. Пример токов в контроле и после действия изопреналина (ИЗО) представлен на рисунке ниже (взяты записи максимумов тока с каждой записи в одной клетке). Амплитуда тока INa после добавления ИЗО увеличилась на 73 ± 25 % по сравнению с контролем (см. рисунок, *в*). Далее были построены активационные кривые *m* для контроля и вещества (см. рисунок, *г*). V1/2 для контроля составляла –41,0 ± 1,2 мВ, после добавления ИЗО –46,1 ± 1,3 мВ. Под действием ИЗО наблюдается смещение активационной кривой *m* влево, смещение полувысоты составляет ~ 5 мВ.

Амплитуда тока ICa, *L* после действия ИЗО увеличилась на 120 % по сравнению с контролем ($p \leqslant 0{,}004$). Сами нормированные усредненные амплитуды составляли: в контроле –18,8 ± 4,3 пА/пФ, после ИЗО –41,5 ± 3,4 пА/пФ.

© С. Г. Коваленко, Ш. Р. Фролова, 2024



Пример токов в контроле и после действия изопреналина: *а* — токи быстрого натриевого канала INa человеческих кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК в контроле (*черная кривая*) и после действия 1 мкМ ИЗО (*синяя кривая*); *б* — вольтамперные кривые I—V для INa в контроле (*черная кривая*, *n* = 12), после добавления ИЗО (*синяя кривая*, *n* = 9); *в* — кривая активации *m* для быстрых натриевых каналов кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК (*черная кривая*, *n* = 12), после ИЗО (*синяя кривая*, *n* = 9); *г* — гистограмма изменения амплитуды кардиомиоцитов в процентах в контроле (*черная колонка*, *n* = 12) и после ИЗО (*синяя колонка*, *n* = 9, p ⩽ 0,009)

Также после добавления ИЗО наблюдается смещение вольтамперной кривой влево на ~ 6 мВ. Амплитуда тока IKs была нормирована на емкость клетки, и при +60 мВ в протоколе максимум плотности тока IKs составил в контроле 3,5 ± 0,5 пА/пФ, в присутствии ИЗО 6,9 ± 0,4 пА/пФ. Амплитуда тока IKs увеличилась на ~ 98 % после введения ИЗО.

В результате установлено, что уже при концентрации изопреналина 1 мкМ происходит значительное увеличение потенциал-зависимых ионных токов INa, ICa, *L* и IKs человеческих кардиомиоцитов, полученных дифференцированием ИПСК человека. Показано, что разница в кинетике между более быстрой активацией ICa, *L* и более медленным увеличением IKs при активации бета-адренорецепторов временно нарушает баланс входящих и выходящих токов и это может пролонгировать ПД и благоприятствовать ранней постдеполяризации, что является фактором развития аритмий.

Литература

1. Grandi E. and Ripplinger C. M. Antiarrhythmic mechanisms of beta blocker therapy // Pharmacological Research. 2019. Vol. 146. P. 104274.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-145

ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННАЯ АТАКА НА МИКОБАКТЕРИИ: НОВЫЙ МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРЕГАЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО ТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ *

MYCOBACTERIA-TARGETED ATTACK: A NEW APPROACH USING A TREHALOSE-CONJUGATED TRICARBOCYANINE DYE

Н. В. Козобкова[1], М. П. Самцов[2], А. П. Луговский[2], Д. С. Тарасов[2], Н. В. Белько[2], А. П. Савицкий[1], А. С. Капрельянц[1], М. О. Шлеева[1]

[1]*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва*
[2]*Институт прикладных физических проблем им. А. Н. Севченко БГУ, Минск*

N. V. Kozobkova[1], M. P. Samtsov[2], A. P. Lugovski[2], D. S. Tarasov[2], N. V. Bel'ko[2], A. P. Savitsky[1], A. S. Kaprelyants[1], M. O. Shleeva[1]

[1]*Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow*
[2]*A. N. Sevchenko Institute of Applied Physical Problems of the Belarusian State University, Minsk*

✉ natalia.cosolapowa@gmail.com

Аннотация

В работе представлен новый трегалозосодержащий трикарбоцианиновый краситель (TCC2Tre), который под действием света ближнего инфракрасного диапазона приводит к более эффективному уничтожению микобактерий в сравнении с красителем, не содержащим трегалозу.

Abstract

The paper presents a novel tricarbocyanine dye functionalized with two trehalose units (TCC2Tre) is developed. Under irradiation, TCC2Tre causes more effective killing of mycobacteria compared to the dye without trehalose conjugation.

Появление и распространение штаммов с устойчивостью к противомикробным препаратам значительно затрудняет лечение инфекций и приводит к утрате эффективности антибиотиков и других антимикробных препаратов. Особенно стоит обратить внимание на штаммы с множественной лекарственной устойчивостью. Кроме того, даже чувствительные к антибиотикам штаммы возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* могут образовывать покоящиеся формы, которые устойчивы к применяемым в клинике антибиотикам. Поэтому необходим альтернативный подход к решению данной проблемы.

Одним из таких подходов является метод антибактериальной фотодинамической инактивации. Некоторые существующие фотосенсибилизаторы (ФС) активны при длине волны, не превышающей 690 нм, и, как правило, не проникают в глубокие слои тканей организма. Следовательно, перспективным направлением исследований является применение новых ФС, специфичных к патогенам и активированных в ближнем инфракрасном диапазоне с увеличенной длиной проникающего действия света для уничтожения микобактерий.

Для повышения специфичности связывания ФС с бактериями использовали конъюгацию флуоресцентных молекул с антибиотиками, пептидами и антителами. [1]. В частности, был синтезирован и изучен ФС BODIPY с конъюгированной трегалозой [2, 3]. Трегалоза является важным компонентом клеточной стенки микобактерий [4], которая может быть создана как самой клеткой, но также взятой извне благодаря активности специфических микобактериальных транспортеров.

Цель работы — получить конъюгат трикарбоцианинового красителя с трегалозой и оценить его фотодинамический эффект на микобактериях (медленно растущем *M. tuberculosis* и быстрорастущем *M. smegmatis*), а также в разных физиологических состояниях.

Конъюгат с трегалозой (TCC2Tre) синтезирован из ранее полученного трикарбоцианинового красителя (TCC). Нами исследована эффективность нового фотосенсибилизатора на непатогенной быстрорастущей микобактерии *M. smegmatis* (в активной и покоящейся форме) и на медленно растущем *M. tuberculosis*. Результаты проведенных экспериментов показали, что при облучении *M. smegmatis* светом 740 нм после их инкубации

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 24-15-00221).

© Н. В. Козобкова, М. П. Самцов, А. П. Луговский, Д. С. Тарасов, Н. В. Белько, А. П. Савицкий, А. С. Капрельянц, М. О. Шлеева, 2024

с TCC2Tre в течение трех часов уменьшает количество жизнеспособных клеток на три порядка, в то время как тот же краситель без трегалозы показал низкую активность при тех же условиях. В отношении покоящейся формы *M. smegmatis* (6 месяцев покоя), как и в случае с активными клетками, наблюдался более выраженный фотодинамический эффект у TCC2Tre.

Подобно экспериментам с *M. smegmatis* TCC2Tre более эффективен против *M. tuberculosis* по сравнению с TCC и даже более выражен по сравнению с результатами на *M. smegmatis* в тех же условиях. С увеличением световой дозы при плотности мощности 240 мВт/см^2 наблюдалось увеличение количества погибших клеток в культуре *M. tuberculosis*. При плотности мощности 468 Дж/см^2 выявлена полная инактивация клеток *M. tuberculosis* при использовании TCC2Tre при воздействии светом с длиной волны 740 нм.

Таким образом, фотодинамическая инактивация микобактерий, осуществляемая с помощью трегалозоспецифичного красителя, активируемого в ближнем инфракрасном диапазоне, эффективна как для микобактерий в активной фазе роста, так и для микобактерий в покоящемся состоянии. Полученные данные открывают перспективные возможности для разработки новых методов фотодинамической терапии туберкулеза с использованием специфически связанных с трегалозой красителей.

Литература

1. Grimmeisen M., Jessen-Trefzer C. Increasing the Selectivity of Light-Active Antimicrobial Agents — Or How To Get a Photosensitizer to the Desired Target. ChemBioChem. 2023. Vol. 24(18): e202300177.

2. Dutta A. K., Choudhary E., Wang X. et al. Trehalose Conjugation Enhances Toxicity of Photosensitizers against Mycobacteria. ACS Central Science. 2019. Vol. 5(4). P. 644–650.

3. Liang J., Liu F., Xu P. et al. Molecular Recognition of Trehalose and Trehalose Analogues by *Mycobacterium tuberculosis* LpqY-SugABC // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2023. Vol. 120(35): e2307625120.

4. Woodruff P. J., Carlson B. L., Siridechadilok B. et al. Trehalose Is Required for Growth of Mycobacterium Smegmatis // Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279(28). P. 28835–28843.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-146

ВЛИЯНИЕ ИЗОФОРМ TPM1.8 И TPM1.9 АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ТРОПОМИОЗИНА НА СВОЙСТВА АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА *

EFFECT OF THE ACTIN-BINDING PROTEIN TROPOMYOSIN ISOFORMS TPM1.8 AND TPM1.9 ON THE PROPERTIES OF THE ACTIN CYTOSKELETON

К. К. Лапшина[1,2], В. В. Нефёдова[2], С. Г. Роман[2], С. Р. Набиев[3], А. М. Матюшенко[2]

[1]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики
[2]Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва
[3]Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

K. K. Lapshina[1,2], V. V. Nefedova[2], S. G. Roman[2], S. R. Nabiev[3], A. M. Matyushenko[2]

[1]Department of Biophysics, Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University
[2]Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow
[3]Institute of Immunology and Physiology UB RAS, Yekaterinburg

✉ lapshina.2003@gmail.com

Аннотация

Перестройка актинового цитоскелета является отличительной чертой раковой трансформации клеток. Мы обратили внимание на актин-связывающие белки Tpm1.8 и Tpm1.9, чья экспрессия снижается при онкотрансформации. Изучено влияние этих изоформ на свойства актинового филамента. Присутствие Tpm1.8 / Tpm1.9 приводит к образованию очень жестких и стабильных структур актина, что может предотвращать их разборку и препятствовать онкотрасформации.

Abstract

The reorganization of the actin cytoskeleton is a distinctive feature of cancer cell transformation. We paid attention to the actin-binding proteins Tpm1.8 and Tpm1.9, which expression decreases during malignant transformation. The effect of these isoforms on the properties of the actin filament has been studied. The presence of Tpm1.8 / Tpm1.9 leads to the formation of very rigid and stable actin structures, which can prevent their disassembly and transformation.

Тропомиозин (Tpm) — это α-спиральный белок, имеющий структуру coiled-coil, который армирует актиновые нити, тем самым влияя на функционирование цитоскелета. Число изоформ Tpm в клетках млекопитающих достигает 40 [1]. В рамках проведенного исследования получены цитоплазматические изоформы Tpm1.8 и Tpm1.9. Их собственные физико-химические свойства, а также свойства актиновых филаментов, декорированных данными изоформами, изучены методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), спектроскопии кругового дихроизма (КД), вискозиметрии, светорассеяния, соосаждения и оптической ловушки.

Для исследования структуры и доменной организации Tpm использованы методы ДСК и КД. Подвергая образцы нагреву и наблюдая за содержанием α-спиралей по поглощению при длине волны 222 нм, удалось зафиксировать резкое изменение молярной эллиптичности, что свидетельствует о понижении спиральности и, как следствие, разрушении регулярной структуры белка. На кривых денатурации после взятия первой производной наблюдался ряд переходов на 40 и 60 °C для Tpm1.8; 45 и 60 °C для Tpm1.9. Для более детального исследования доменной структуры Tpm использован метод ДСК. Пик на графике зависимости избыточного теплопоглощения от температуры соответствовал плавлению калориметрического домена — участка в молекуле Tpm, который денатурирует независимо от других. Деконволюционный анализ выделил по три домена у каждой из изоформ. Температуры плавления доменов 1 и 2 отличаются между изоформами на 3–5 °C, а калориметрическая энтальпия — в 4,4 и 1,9 раз, соответственно. Такие различия могут быть связаны с вариабельность в 6-м экзоне, представленным формой 6a в Tpm1.9 и 6b — в Tpm1.8.

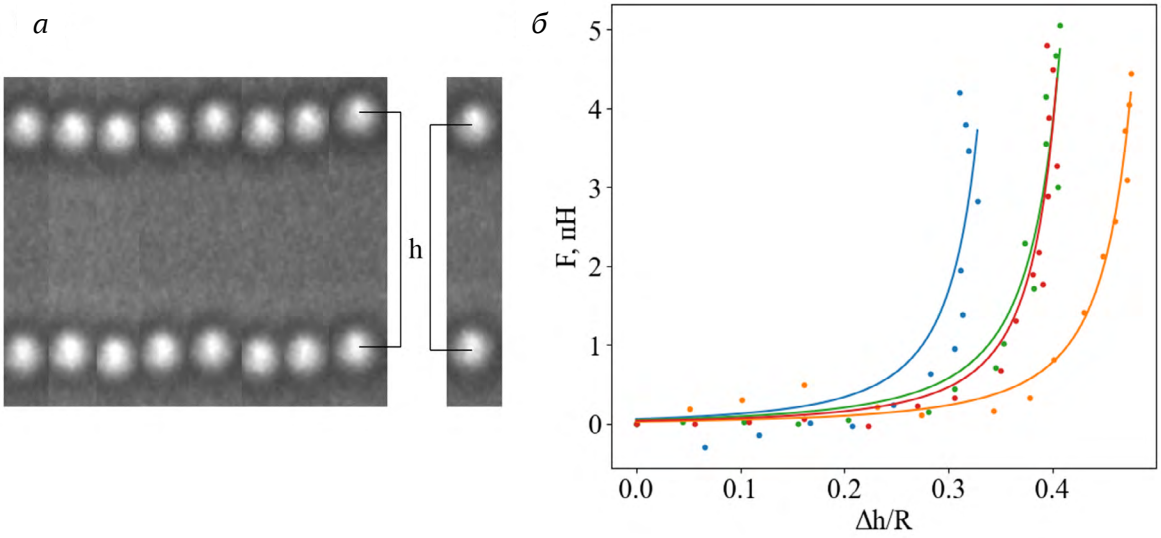
Способность Tpm образовывать непрерывный тяж вследствие концевых взаимодействий между соседними молекулами оценена с помощью метода вискозиметрии. При равной концентрации и ионной силе показатель вязкости выше у изоформы Tpm1.9. Поскольку изоформы имеют отличия лишь в центральном 6-м экзоне, то можно предположить, что для структуры Tpm характерны дальнодействующие эффекты, при которых централь-

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-74-10106).
© К. К. Лапшина, В. В. Нефёдова, С. Г. Роман, С. Р. Набиев, А. М. Матюшенко, 2024

ная часть молекулы влияет на ее концевые участки. Стоит отметить, что вязкость Tpm1.8 / Tpm 1.9 оказалось аномально высокой по сравнению с большинством изоформ Tpm.

Главным партнером Tpm в клетке является F-актин. Для определения сродства данных изоформ Tpm к F-актину применен анализ соосаждения этих белков. Значения $K_{50\%}$, соответствующие концентрации Tpm, при которой актин наполовину им насыщен, варьировались от 0,3 ± 0,12 мкМ для Tpm1.8 до 0,79 ± 0,18 мкМ для Tpm1.9. Стабильность белковых комплексов Tpm с F-актином измеряли посредством регистрации светорассеяния при длине волны 350 нм при нагревании с постоянной скоростью. Изоформа Tpm1.9 имеет более высокую температуру диссоциации комплекса с F-актином, чем изоформа Tpm1.8.

Для того чтобы исследовать свойства комплексов полимерного F-актина, декорированного Tpm1.8 и Tpm1.9, мы измерили изгибную жесткость таких комплексов с помощью двухлучевой оптической ловушки (см. рисунок, *а*). Фибриллярный актин и актиновые филаменты, декорированные Tpm, растягивали с шагом 5 нм, при этом регистрировали силу и расстояние между шариками (см. рисунок, *б*). Жесткость тонких нитей, декорированных Tpm1.8 и Tpm1.9, статистически значимо отличалась от жесткости F-актина. Его изгибная жесткость в комплексе с Tpm1.8 и Tpm1.9 составила $3{,}75 \cdot 10^{26}$ Н · м^2 (IQR 2,7–5,55; n = 22) и $4{,}8 \cdot 10^{26}$ Н · м^2 (IQR 3,87–6,95; n = 23) соответственно, в то время как F-актин имеет изгибную жесткость $2{,}35 \cdot 10^{26}$ Н · м^2 (IQR 1,6–5,3; n = 18).



Исследование свойств комплексов полимерного F-актина, декорированного Tpm1.8 и Tpm1.9:
а — микрофотографии последовательного растяжения «гантели», образованной удерживаемыми в ловушке полистироловыми шариками и тонкой нитью (на фото не изображена), и возвращения ее в исходное состояние;
б — диаграмма зависимости силы, приложенной к концу «гантели», от безразмерного растяжения, где Δh — изменение расстояния между шариками, а R = 450 нм — радиус шарика. *Разными цветами* обозначены четыре растяжения из серии экспериментов для F-актина, декорированного Tpm1.9. Для расчетов использовали ранее предложенную математическую модель [2]

По-видимому, высокое сродство изоформ Tpm1.8 и 1.9 к F-актину и образование жестких нитей актина, декорированного этими изоформами, коррелирует с присутствием Tpm1.8 и Tpm1.9 в стабильных клеточных структурах.

Литература

1. Geeves M.A., Hitchcock-DeGregori S.E., Gunning P.W. A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms // Journal of Muscle Research and Cell Motility. 2015. Vol. 36. P. 147–153.

2. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V. et al. Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament // Biophysical Journal. 2015. Vol. 109. P. 373–379.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-147

ВЛИЯНИЕ ТРОМБИНА И ГЕМАТОКРИТА НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ

THE INFLUENCE THROMBIN CONCENTRATION AND HEMATOCRIT ON THE RHEOLOGICAL PROPERTIES OF BLOOD

А. О. Лобанова[1], О. В. Демкин[1], А. А. Золотарев[2]

[1] *Томский государственный университет*
[2] *НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга, Томск*

A. O. Lobanova[1], O. V. Demkin[1], A. A. Zolotarev[2]

[1] *Tomsk State University*
[2] *Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk*

✉ lobanovaanna.00@mail.ru

Аннотация

В работе исследована зависимость процесса гемокоагуляции от реологических свойств крови. Результаты подтверждают взаимосвязь между процессами гемокоагуляции и гемореологическими параметрами, что важно учитывать при оценке гемостатического статуса у пациентов с нарушениями системы свертывания крови.

Abstract

The work investigated the dependence of the hemocoagulation process on the rheological properties of blood. The results confirm the relationship between hemocoagulation processes and hemorheological parameters, which is important to consider when assessing hemostatic status in patients with disorders of the blood coagulation system.

Система гемостаза играет ключевую роль в поддержании жизнедеятельности организма, обеспечивая текучесть крови в физиологических условиях и предотвращая ее потерю через механизм свертывания [1].

Расстройства системы гемостаза чрезвычайно опасны и могут привести к осложнениям — кровотечению или тромбозу, что определяет приоритетность исследования свертывания в числе прикладных биомедицинских задач. Следует отметить, что система регулирования свертываемости крови хорошо изучена, однако это не означает полного понимания всех процессов и механизмов, лежащих в основе гемостаза [2]. Процесс гемокоагуляции задается соотношением форменных элементов и плазменных компонент крови, в свою очередь, определяющих ее реологические свойства.

В работе исследована зависимость реологических свойств крови от гематокрита, концентрации тромбина. Мы предполагаем, что более высокий гематокрит (Hct) и короткое тромбиновое время приводят к более высокой динамической вязкости, что может замедлять кровоток и влиять на скорость образования сгустка. Соответственно, более низкий гематокрит (Ht) и повышенное тромбиновое время обусловливают более низкую динамическую вязкость крови. Исследования проводились на программно-аппаратном комплексе — пьезотромбоэластографе при частоте иглы-резонатора 3 000 Гц.

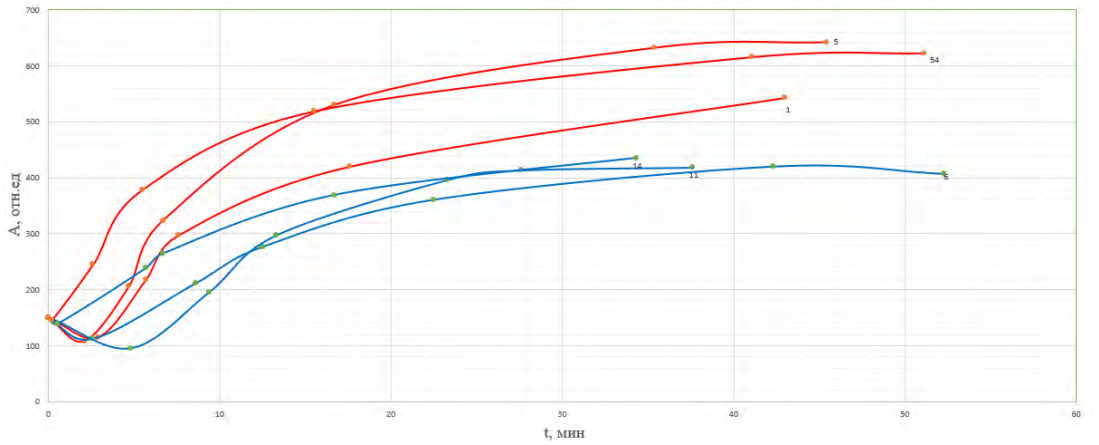
На рис. 1 приведены пьезотромбоэластограммы цельной крови пациентов с разными значениями гематокрита и тромбинового времени, полученные методом низкочастотного пьезотромбоэластографа (НПТЭГ) [2].

Исследование показало, что у группы пациентов с высоким гематокритом (Ht > 40 %, *красные кривые*) и коротким тромбиновым временем пьезотромбоэластограммы расположены выше пьезотромбоэластограмм второй группы пациентов с пониженным гематокритом (Ht < 40 %, *синие кривые*) и высоким тромбиновым временем. Это свидетельствует о повышенной вязкости крови в первом случае по сравнению со вторым.

На рис. 2 приведены усредненные по 10 пациентам значения сигналов пьезоэлектрического датчика, пропорциональных коэффициенту вязкости крови и их первых производных, пропорциональных концентрации тромбина [3], в зависимости от времени коагуляции крови для пациентов с Hct < 40 % (*синие кривые*) и с Hct > 40 % (*красные кривые*). Так как в случае высоких скоростей сдвига концентрация эритроцитов и их деформируемость являются детерминантой в динамике процесса коагуляции, различие уровня гематокрита сказывается на поведении пьезотромбоэластограмм. В случае Hct < 40 % процесс коагуляции осуществляется медленнее, чем для случая Hct > 40 %. Это же наблюдается и в динамике наработки тромбина. Как видно

© A. O. Lobanova, O. V. Demkin, A. A. Zolotarev, 2024

из рис. 2, достижение максимального значения концентрации тромбина происходит на 5 мин. раньше для случая Hct > 40 %.



Рису. 1. Пьезотромбоэластограмма цельной крови пациентов с разными значениями гематокрита и тромбинового времени

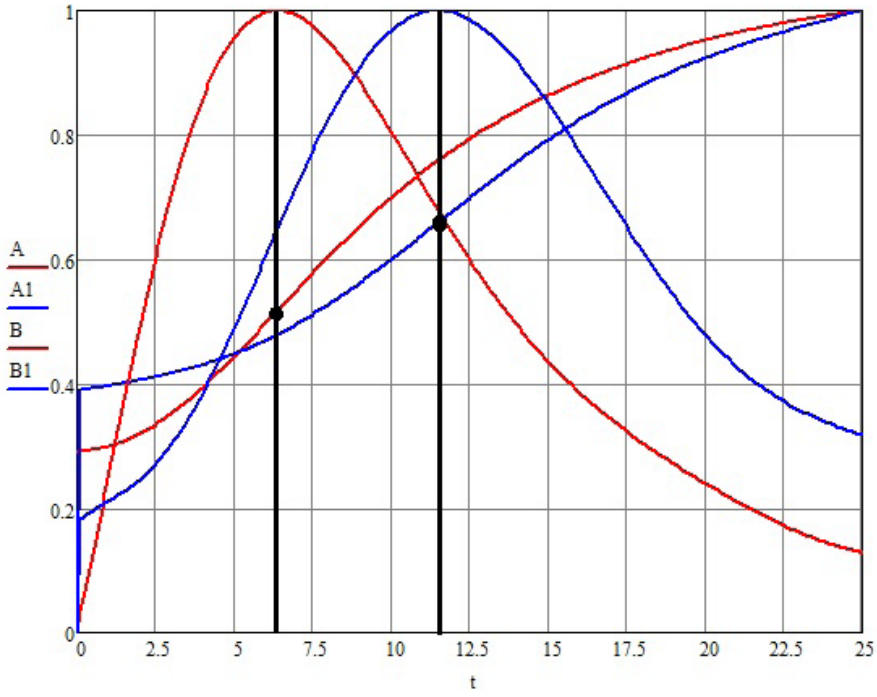


Рис. 2. Динамика коагуляции крови для групп пациентов с разным значением гематокрита

Полученные результаты подтверждают взаимосвязь между процессами гемокоагуляции и гемореологическими параметрами, что необходимо учитывать при оценке гемостатического статуса у пациентов с нарушениями системы свертывания крови.

Литература

1. Versteeg H. H., Heemskerk J. W., Levi M., Reitsma P. H. New fundamentals in hemostasis // Physiological Reviews. 2013. Vol. 93(1). P. 327–358.

2. Тютрин И. И., Удут В. В. Низкочастотная пьезотромбоэластография цельной крови: алгоритмы диагностики и коррекции гемостазиологических расстройств. Томск, 2016. 169 с.

3. Демкин В. П., Мельничук С. В., Демкин О. В. и др. Метод оценки концентрации тромбина по данным мониторинга вязкоупругих свойств нативной крови в процессе гемокоагуляции // Известия вузов. Физика. 2021. Т. 65, № 7. С. 79–84.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-148

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЗОБЕНЗОЛА НА БЫСТРЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ В НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫСЫ

THE EFFECT OF NEW AZOBENZENE DERIVATIVES ON VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL IN RAT NEONATAL CARDIOMYOCYTES

А. Т. Мифтахова[1], С. Г. Коваленко[1,2], Ш. Р. Фролова[1,2]

[1]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2]*Московский областной научно-клинический институт им. М. Ф. Владимирского*

A. T. Miftakhova[1], S. G. Kovalenko[1,2], S. R. Frolova[1,2]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute*

✉ miftakhova.at@phystech.edu

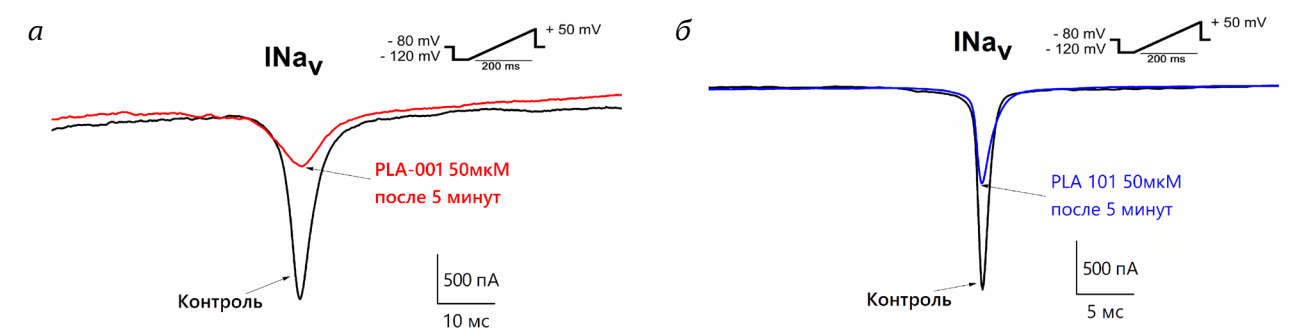
Аннотация

Производные азобензола, безопасные аналоги AzoTAB (бромид азобензола триметиламмония), могут быть использованы в качестве перспективных фоточувствительных блокаторов ионных каналов. В работе методом пэтч-кламп исследовано влияние двух новых производных азобензола на потенциал-зависимые быстрые натриевые каналы в крысиных неонатальных кардиомиоцитах.

Abstract

Azobenzene derivatives, safe analogs of AzoTAB (azobenzene trimethylammonium bromide), can be used as perspective photosensitive ion channel blockers. In this research, the effect of two new azobenzene derivatives on voltage-gated fast sodium channels in rat neonatal cardiomyocytes was studied using the patch clamp method.

В настоящее время для борьбы с аритмией используются разные методики: фармакологическая, абляция, электрокардиостимуляторы. Однако каждая из них имеет побочные эффекты по причине неселективности, инвазивности и т. д. [1]. Перспективным вариантом терапии можно считать фотофармакологию, где за счет фоточувствительных препаратов модулируется активность ионных каналов в зависимости от изоформы соединения. Одним из таких соединений является AzoTAB (бромид азобензола триметиламмония). Данное вещество переходит из преимущественно транс-формы в преимущественно цис-форму под воздействием мягкого ультрафиолета, при этом транс-форма блокирует потенциал-зависимые натриевые каналы [2], за счет этого может устранить очаг аритмии без образования рубцовой ткани. Однако AzoTAB оказался крайне цитотоксичным [3] в рабочей концентрации. Исходя из сказанного, поиск нетоксичного и эффективного производного азобензола является актуальной задачей.



Быстрый натриевый ток INa в неонатальных кардиомиоцитах желудочков крыс в контроле (*черная кривая*) и под действием исследуемых веществ: *а* — соединение 001 (50 μM, через 5 мин); *б* — соединение 101 (50 μM, через 5 мин)

© А. Т. Мифтахова, С. Г. Коваленко, Ш. Р. Фролова, 2024

В работе исследовалось влияние двух производных азобензола (PLA-001 и PLA-101) на потенциал-зависимые быстрые натриевые каналы. Соединения были синтезированы и предоставлены для исследования в Российском технологическом университете (РТУ МИРЭА; А. Ноев и др.) [4]. Токи INa крысиных кардиомиоцитов регистрировались с помощью метода пэтч-кламп в конфигурации перфорированная «целая клетка». Контрольное измерение проводилось на клетках в стандартном внеклеточном растворе для записи токов быстрых натриевых каналов INa. Далее внеклеточный раствор заменялся на 50 μM раствор тестируемого вещества во внеклеточном растворе. После инкубации в течение пяти минут регистрировался ток INa. Измерения с исследуемыми веществами проводились в темноте. После добавления вещества PLA-001 амплитуда натриевого тока уменьшалась на 70 % (см. рисунок, *а*), вещество PLA-101 уменьшило амплитуду на 50 % (см. рисунок, *б*).

В результате показано, что производные азобензола PLA-001 и PLA-101 в транс-форме (50 μM) значительно уменьшают амплитуды натриевого тока. Подобный эффект показывает, что данные производные являются перспективными для фотофармакологии. В дальнейшем требуется детальное изучение действия данных соединений на другие потенциал-зависимые ионные каналы в транс- и цис-формах.

Литература

1. Kingma J., Simard C., Drolet B. Overview of Cardiac Arrhythmias and Treatment Strategies // Pharmaceuticals (Basel). 2023. Vol. 16 (6): 844.

2. Frolova S. R., Gaiko O., Tsvelaya V. A. et al. Photocontrol of Voltage-Gated Ion Channel Activity by Azobenzene Trimethylammonium Bromide in Neonatal Rat Cardiomyocytes // PLoS One. 2016. Vol. 11 (3): e0152018.

3. Liu Y.-C., Le Ny AL., Schmidt J. et al. Photo-assisted gene delivery using light-responsive catanionic vesicles. Langmuir. 2009. Vol. 25 (10): 5713-24.

4. Noev A., Kuznetsov N., Korenev G. et al. A Novel Photoswitchable Azobenzene-Containing Local Anesthetic Ethercaine with Light-Controlled Biological Activity In Vivo // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23 (10): 5352.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-149

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ N-БЕНЗИМИДАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ *

INVESTIGATION OF THE PROPERTIES OF N-BENZIMIDAZOLE DERIVATIVES OF OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES

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

На сегодняшний день множество научных задач и исследований задействуют олигонуклеотиды — короткие синтетические фрагменты нуклеиновых кислот. Олигонуклеотиды специфически связываются с комплементарными одноцепочечными нуклеиновыми кислотами с образованием антипараллельной двойной спирали. Свойства олигонуклеотидов могут быть направленно изменены, а области их применения расширены путем введения химических модификаций в структуру нуклеотидов.

Abstract

To date, many scientific tasks and research involve oligonucleotides — short synthetic fragments of nucleic acids. Oligonucleotides specifically bind to complementary single-stranded nucleic acids to form an antiparallel double helix. The properties of oligonucleotides can be changed in a targeted manner, and their fields of application expanded by introducing chemical modifications into the structure of nucleotides.

Объектом исследования является новый класс аналогов нуклеиновой кислоты — олигонуклеотиды, имеющие бензоимидазольные модификации фосфатных групп (ФАО) — недавно разработанные и впервые синтезированные в ИХБФМ СО РАН. 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] и возможности их применения в качестве праймеров в ПЦР [2]. На гибридизационные свойства олигонуклеотидов влияет множество факторов: нуклеотидная последовательность и ГЦ состав, длина цепи, наличие модификаций, а также условия, в которые они помещены: концентрации ионов, pH раствора, наличие сорастворителей и др. В работе исследованы свойства комплексов ДНК с ФАО, не только для комплементарных комплексов, но и тех, в которых присутствуют одиночные нуклеотидные несоответствия (мисматчи).

Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала показано, что термостабильность комплексов снижается при введении модификации как в полностью комплементарные комплексы, так и в комплексы с нуклеотидными несоответствиями, у которых термостабильность снижена по сравнению с комплементарным комплексом. Показано, что при добавлении этанола, этиленгликоля и ДМСО снижается разница в термостабильности между нативным ДНК / ДНК и ФАО / ДНК дуплексами, что свидетельствует о гидрофобном вкладе N-бензимидазольной фосфорамидной группы в снижение термостабильности ФАО/ДНК комплексов относительно ДНК / ДНК дуплексов. Также определено, что исследуемые комплексы имеют B-форму, а модификация несущественно влияет на форму спирали.

Исследована скорость и эффективность эллонгации тринадцатизвенных ФАО праймеров в комплексе с 22-звенной ДНК-матрицей как для систем с мисматчами, 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. В частности, модификация первого межнукотидного фосфатного

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-74-01116).

© Ф. В. Морозова, В. М. Голышев, А. А. Ломзов, 2024

остатка с 3’-конца праймера приводила к заметному снижению эффективности его удлинения, в то время как модификация второго фосфата в меньшей степени ингибировала процесс эллонгации как для комплементарных комплексов, так и комплексов с мисматчем.

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 // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2024. Vol. 693. P. 149390.

2. Chubarov A. S., Baranovskaya E. E., Oscorbin I.P et al. Phosphoramidate Azole Oligonucleotides for Single Nucleotide Polymorphism Detection by PCR // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25, № 1. P. 617.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-150

РОЛЬ СЛАБЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА PML-V В ОБРАЗОВАНИИ ЖИДКО-КАПЕЛЬНЫХ КОНДЕНСАТОВ *

THE ROLE OF WEAK NONSPECIFIC INTERACTIONS OF THE C-TERMINAL DOMAIN OF THE PML-V PROTEIN IN THE FORMATION OF LIQUID-DROP CONDENSATES

Е. М. Неделяев, С. А. Силонов, А. А. Гаврилова, Е. Ю. Смирнов, Е. А. Шмидт, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, А. В. Фонин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E. M. Nedelyaev, S. A. Silonov, A. A. Gavrilova, E. Y. Smirnov, E. A. Smidt, I. M. Kusnetsova, K. K. Turoverov, A. V. Fonin

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ nedelyaev99@mal.ru

Аннотация

Исследование PML-телец важно из-за их полифункциональности и связи с удлинением теломер в раковых клетках, что делает их потенциальными мишенями для лечения онкологических заболеваний. В работе изучено фазовое разделение С-концевого домена белка PML-V *in vitro*. Флуоресцентная микроскопия показала, что конденсаты этого белка имеют высокую долю немобильной фракции, а важную роль в их образовании играют слабые неспецифические взаимодействия.

Abstract

The study of PML bodies is important due to their multifunctionality and their association with telomere elongation in cancer cells, making them potential targets for cancer treatment. This work investigates the phase separation of the C-terminal domain of the PML-V protein *in vitro*. Fluorescence microscopy revealed that the condensates of this protein have a high proportion of immobile fraction, and that weak nonspecific interactions play a significant role in their formation.

PML-тельца — ядерные полифункциональные немембранные органеллы, участвующие в регуляции транскрипции, стресс-ответе, клеточной дифференцировке и переходе клеток в сенесцентное состояние. При ряде форм онкологических заболеваний PML-тельца ассоциируются с процессом альтернативного удлинения теломер (ALT-associated PML-Bodies, APB). Укорочение теломер при деассоциации APBs позволяет рассматривать эти немембранные органеллы в качестве потенциальной терапевтической мишени для подавления ALT, а, следовательно, и для борьбы с трудно поддающимися лечению в настоящее время формами онкологических заболеваний.

Каркасный белок PML-телец, белок промиелоцитарного лейкоза (PML), существует в виде семи основных изоформ, различающихся по размеру и аминокислотной последовательности их С-концевого домена. Ранее нами было показано, что благодаря заряженным аминокислотным остаткам и неупорядоченной структуре С-концевые домены, по-видимому, играют определяющую роль в фазовом разделении типа «жидкость — жидкость», которое лежит в основе формирования PML-телец [1–3]. Установлено, что способность к фазовому разделению различных изоформ PML зависит от структуры С-концевого домена.

Целью настоящего исследования было изучение процесса фазового разделения С-концевого домена изоформы PML-V, являющейся одной из наиболее стабильных компонент PML-телец.

Для PML-V было установлено, что его С-конец способствует сборке, поддержанию и структурной стабильности ядерных PML-телец. Было показано, что С-концевые домены PML-V (PML-V_CT) способны к самопроизвольному фазовому разделению в клетках, нокаутных по PML.

Для того, чтобы исследовать механизм этого процесса в настоящей работе было изучено фазовое разделение С-концевого домена PML-V в зависимости от концентрации этого белка различных условиях: при различных pH и ионной силе раствора, при имитации условий краудинга, при наличии в растворе агентов, ингибирующих

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-15-00429).

© Е. М. Неделяев, С. А. Силонов, А. А. Гаврилова, Е. Ю. Смирнов, Е. А. Шмидт, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, А. В. Фонин, 2024

электростатические (АТФ) или гидрофобные (1,6-гександиол) взаимодействия. Образование телец регистрировалось по флуоресценции зелёного флуоресцентного белка sfGFP, слитого с целевым белком.

Показано, что С-концевые домены PML-V *in vitro* способны претерпевать фазовое разделение с образованием конденсатов, свойства которых схожи с тельцами, образованные PML-V в клетках. Регистрация восстановления флуоресценции после обесцвечивания (FRAP) показала, что конденсаты, образованные PML-V_CT, в растворе имеют слабое восстановление интенсивности флуоресценции (10–15 %), что свидетельствует о высокой доле немобильной фракции в образованных конденсатах, также, как и в тельцах, образованных изоформой PML-V в клетке.

Показано, что введение в раствор АТФ, ингибирующего электростатические взаимодействия между молекулами белка, нарушало фазовое разделение PML-V_CT, что свидетельствует о существенной роли электростатических взаимодействий в фазовом разделении PML-V_CT.

Условия, имитирующие краудинг (PEG 12000, 200 мг / мл) способствовали фазовому разделению PML-V_CT: в присутствии PEG конденсаты формировались при концентрации PML-V_CT в 10 мкМ, а в отсутствие — только при 30 мкМ и нивелировали действие АТФ, что свидетельствует о роли гидрофобных взаимодействий в присутствии краудинг агента. Это было подтверждено в экспериментах с агентом, ингибирующем гидрофобные взаимодействия: введение 1,6-гександиола (5/10 %) препятствовало образованию капель в условиях макромолекулярного краудинга.

Изменение pH (в пределах от 2 до 11) и ионной силы раствора (от 50 до 500 мМ NaCl) не влияло на процесс фазового разделения.

Литература

1. Fonin A. V., Silonov S. A., Shpironok O. G. et al. The Role of Non-Specific Interactions in Canonical and ALT-Associated PML-Bodies Formation and Dynamics // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 2. P. 5821.

2. Fonin A. V., Silonov S. A., Fefilova A. S. et al. New Evidence of the Importance of Weak Interactions in the Formation of PML-Bodies // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23.P. 1613.

3. Antifeeva I. A., Fonin A. V., Fefilova A. S. et al. Techniques for the Detection and Analysis of LLPS and MLOs. Droplets Life. 2023. P. 205–231.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-151

ВЛИЯНИЕ КОСМИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ ЧЕЛОВЕКА*

EFFECT OF COSMIC RADIATION ON HUMAN SPERM

А. П. Пархаева[1,2], М. А. Овчинников[3], А. П. Евсеев[3], Э. П. Александрова[1], О. М. Марченко[3], Е. Ю. Симоненко[1]

[1]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
[2]Федеральный научно-клинический центр космической медицины ФМБА России, Москва
[3]Научно-исследовательский институт ядерной физики им. Д. В. Скобельцына Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

A. P. Parkhaeva[1,2], M. A. Ovchinnikov[3], A. P. Evseev[3], E. P. Alexandrova[1], O. M. Marchenko[3], E. U. Simonenko[1]

[1]Lomonosov Moscow State University
[2]Federal Research & Clinic Center of Space Medicine, FMBA of Russia, Moscow
[3]Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University

✉ athinktoo@gmail.com

Аннотация

Интерес к дальним космическим полетам неуклонно растет с каждым годом и, рано или поздно, человечество встанет перед вопросом транспортировки биологического материала на дальние межпланетные расстояния. Поэтому задача, связанная с транспортировкой и хранением половых клеток, является актуальной и перспективной. В данной работе показано, что космическое излучение при длительном воздействии на сперматозоиды человека вызывает изменения в морфологических параметрах клеток, в том числе вызывает фрагментацию ДНК.

Abstract

Interest in long-range space missions is steadily growing every year and, sooner or later, mankind will face the question of the delivery of biological material over long interplanetary distances. Therefore, the task related to the transportation and storage of germ cells is relevant and promising. In this paper it is shown that cosmic radiation with a long-term effect on human sperm causes changes in cell parameters, including DNA fragmentation.

Одним из наиболее опасных факторов космической среды для клеток, в том числе для сперматозоидов, является излучение, в состав которого входит гамма-излучение, протоны, электроны и другие активные частицы. Интенсивность космического излучения может составлять от 0,3 до 0,8 мГр/день на МКС и на Марсе и до 1,4 мГр/день на Луне. Если массовые частицы можно экранировать, то гамма-излучение отличается высокой проникающей способностью и от него особенно сложно защитить биологический материал. Под воздействием гамма-излучения в клетках может индуцироваться окислительный стресс — нарушение баланса между выработкой активных форм кислорода (АФК) и способностью клетки их поглощать. В клетках образуются гидроксильный радикал, перекись водорода (H_2O_2), гидропероксид (HO_2), супероксид-анион-радикал (O_2), атомарный и синглетный кислород и т. п. АФК способны влиять на метаболические пути, окисляя белки или выполняя роль сигнальных молекул. Кроме того, АФК окисляют ненасыщенные жирные кислоты в мембранах клетки, и продуктами этого окисления являются элементы, вызывающие повреждение в молекуле ДНК. Окислительный стресс в сперматозоидах очень сложно замедлить или остановить, так как сперматозоид транскрипционно и трансляционно не функционирует. В отличие от соматических клеток, в которых существуют системы антиоксидантной защиты, поддерживающие баланс АФК, цитоплазма сперматозоидов бедна на ферменты антиоксидантной защиты. Так, в сперматозоидах человека отсутствуют формы GPX2, GPX3, GPX5, а GPX4 неактивна; также отсутствует каталаза. Поэтому сперматозоиды крайне уязвимы к окислительному стрессу. Кроме того, непосредственно само гамма-излучение может вызвать повреждения ДНК. Фрагментация ДНК в сперматозоидах отрицательно сказывается на вероятности оплодотворения как *in vivo*, так и *in vitro*, а также на качестве развития эмбриона.

Цель исследования — определить влияние гамма-излучения на сперматозоиды человека.

В ходе данной работы сперматозоиды человека подвергались облучению, источником излучения являлся изотоп Cs^{138}. В его спектре содержатся как бета-, так и гамма-частицы, однако, как было указано выше, мы счита-

* Работа выполнена в рамках проекта 23-Ш01-15 междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. Ломоносова «Фундаментальные и прикладные исследования космоса».

© А. П. Пархаева, М. А. Овчинников, А. П. Евсеев, Э. П. Александрова, О. М. Марченко, Е. Ю. Симоненко, 2024

ем, что бета-компонента успешно экранируется пробиркой, в которой содержатся клетки, тогда как гамма-компонента воздействует на клетки. Образцы клеток облучались дозами 0,4 мГр в течение 24 ч, 60 мГр в течение 12 ч и 200 мГр в течение 24 ч что эквивалентно нахождению 1, 30 и 365 дням на МКС соответственно. Далее клетки инкубировались, изменение показателей клеток регистрировали через 12, 24, 48 и 72 ч после облучения.

Для определения влияния излучения на сперматозоиды проводились анализы подвижности сперматозоидов с помощью камеры Маклера, тесты VitalScreen на жизнеспособность клеток, а также тесты на фрагментацию ДНК методом SCD.

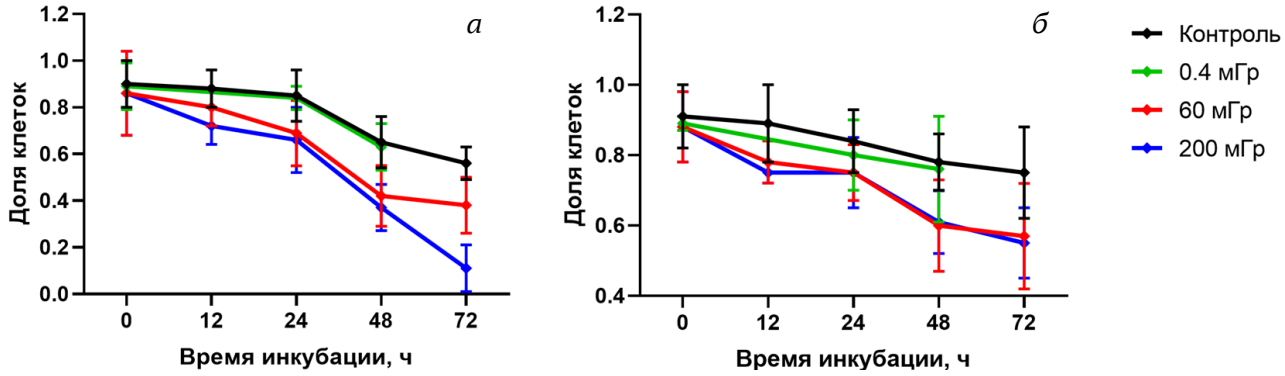


Рис. 1. Параметры сперматозоидов в зависимости от дозы облучения: *а* — индекс подвижности; *б* — целостность мембраны

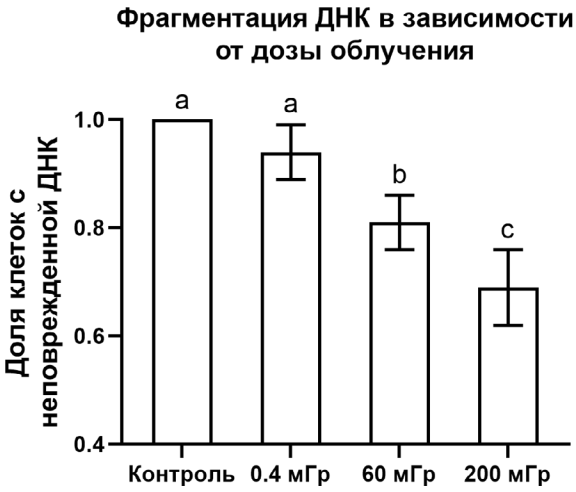


Рис. 2. Целостность ДНК сперматозоидов в зависимости от дозы облучения

Тесты показали, что излучение 0,4 мГр не влияет на клетки (рис. 1, 2), излучение 60 мГр вызывает изменения в клетках после длительной инкубации, в том числе достоверно увеличивает фрагментацию ДНК на 20 % по сравнению с контролем. Под воздействием излучения в 200 мГр изменения более выражены, однако видны наиболее отчетливо также после инкубации клеток. Фрагментация ДНК при данном типе облучения достоверно увеличивается на 30 % по сравнению с контрольной группой клеток.

Таким образом, в данном исследовании показано, что гамма-излучение при длительном воздействии на сперматозоиды человека вызывает изменения в параметрах клеток, в том числе вызывает фрагментацию ДНК.

Литература

1. Aitken R. J., Gibb Z., Baker M. A., Drevet J., Gharagozloo P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa // Reproduction, Fertility and Development. 2016. Vol. 28(1-2). P. 1–10.

2. Wright C., Milne S., Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility // Reproductive BioMedicine Online. 2014. Vol. 28. P. 684–703.

3. Самойлов А. С., Ушаков И. Б., Шуршаков В. А. Радиационное воздействие в орбитальных и межпланетных космических полетах: мониторинг и защита // Экология человека. 2019. Т. 26(1). С. 4–9.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-152

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ 8-ОКСО-АДЕНОЗИН, ОБЛАДАЮЩИЙ РОТОРНЫМ ЭФФЕКТОМ *

PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF DNA DUPLEXES CONTAINING MODIFIED 8-OXO-ADENOSINE WITH ROTOR EFFECT

А. А. Пушкаревская[1,2], А. В. Аралов[3], А. А. Ломзов[1,2]

[1]*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2]*Новосибирский государственный университет*
[3]*Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

A. A. Pushkarevskaya[1,2], A. V. Aralov[3], A. A. Lomzov[1,2]

[1]*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Novosibirsk State University*
[3]*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ lomzov@niboch.nsc.ru

Аннотация

При дизайне 2′-дезокси-7,8-дигидро-8-оксо-N6-(3-метилбензотиазол-2(3H)-илиден)аденозина (X) предполагалось присутствие роторного эффекта в C6-N связи, предполагалось, что модифицированный нуклеозид в свободном состоянии практически не флуоресцирует, однако в составе дуплексов значительно увеличивает флуоресценцию за счет стэкинг взаимодействий и формирования водородных связей. Данный эффект может быть использован для обнаружения SNP.

Abstract

The design of 2′-deoxy-7,8-dihydro-8-oxo-N6-(3-methylbenzothiazol-2(3H)-ylidene)adenosine (X) assumed the presence of a rotor effect in the C6-N bond, suggesting that the modified nucleoside hardly fluoresces in the free state, but significantly increases fluorescence as part of duplexes due to stacking interactions and hydrogen bond formation. This effect can be used for SNP detection.

В настоящее время разработано значительное разнообразие флуоресцирующих ДНК вставок. Данные модификации нашли широкое применение в различных областях исследований, так как являются удобным инструментом детекции изменения среды, например вязкости, как *in vitro*, так и *in vivo* для визуализации процессов в клетках.

Целью нашего исследования было изучение физико-химических свойств олигодезоксирибонуклеотидов (ОДН), содержащих модифицированный 8-оксо-аденозин (X), обладающий роторным эффектом.

С использованием метода оптической спектроскопии определен коэффициент экстинкции X, величина которого составила $24{,}3 \times 10^3$ $M^{-1}см^{-1}$. В результате исследования флуоресцентных свойств выяснено, что максимум его спектра поглощения находится на 346 нм, а максимум излучения флуоресценции на 420 нм. Для проверки роторного эффекта использовали бинарную систему глицерин-вода. При увеличении вязкости среды происходит увеличение квантового выхода флуоресценции нуклеотида с 1,2 ± 0,2 % в воде более чем в 50 раз в глицерине.

Также исследованы гибридизационные свойства олигонуклеотидов, содержащих модификацию в N6-положении. Введение модификации снижает термическую стабильность ДНК дуплексов с однонуклеотидными несоответствиями падает в ряду оснований C > T > G > A, находящихся напротив модификации в сравнении с тем, когда на месте модифицированного нуклеотида находится тимидин, дестабилизация комплексов наблюдается только в случае расположения A напротив модификации.

Изучение флуоресцентных свойств олигонуклеотидов, содержащих X, и их дуплексов с ДНК показало, что происходит увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению со свободным нуклеозидом. В спектрах возбуждения регистрировали максимум на 36 нм, а в спектрах испускание флуоресценции на 384 нм. При этом стоксов сдвиг уменьшается с 74 до 14 нм для свободного нуклеотида. Величина квантового выхода флуоресценции флуорофора в составе олигонуклеотидов зависит от нуклеотидов, окружающих модифицированный нуклеозид и варьируют в диапазоне от 9,4 ± 0,3 % до 24 ± 2,5 %. При формировании дуплексов с ДНК изменения

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 123021600208-7.
© А. А. Пушкаревская, А. В. Аралов, А. А. Ломзов, 2024

в величине квантового выхода флуоресценции разнонаправленны в зависимости от нуклеотидного окружения флуорофора и типично находятся в рамках величин экспериментальных погрешностей и не превышают нескольких процентов.

Для объяснения закономерностей, наблюдаемых в экспериментах методами молекулярной динамики и квантовой химии были исследованы структуры модифицированных комплексов. Было выяснено, что модифицированный нуклеозид вытесняет напротив стоящее основание из двойной спирали ДНК.

Так как флуорофоры, обладающие роторной подвижностью, в настоящее время малоизучены наши данные могут быть использованы для понимания механизмов данного эффекта и применимы в разработке биосенсоров в медицине для детекции социально значимых заболеваний.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-153

МЕДНЫЙ ХЛОРОФИЛЛИН И РИБОКСИН (ИНОЗИН) КАК РАДИОЗАЩИТНЫЕ СРЕДСТВА *

COPPER CHLOROPHYLLIN AND RIBOXIN (INOSINE) AS RADIOPROTECTIVE AGENTS

Л. А. Ромодин, О. В. Никитенко, Т. М. Бычкова, А. А. Московский

Государственный научный центр Российской Федерации —
Федеральный медицинский биофизический центр им. А. И. Бурназяна ФМБА России, Москва

L. A. Romodin, O. V. Nikitenko, T. M. Bychkova, A. A. Moskovskij

State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center,
FMBA of Russia, Moscow

✉ rla2904@mail.ru

Аннотация

Были изучены радиозащитные свойства медного хлорофиллина и рибоксина. Оба вещества способствуют повышению выживаемости облученных мышей и снижению радиационно-индуцированного окислительного стресса. Угнетение хлорофиллином клеток линии A549 актуализирует разработку способов его применения для повышения эффективности и снижения негативных последствий лучевой терапии.

Abstract

In the course of this work, the radioprotective properties of copper chlorophyllin and riboxin were studied. Both substances contribute to improving the survival rate of irradiated mice and reducing radiation-induced oxidative stress. The suppression of chlorophyllin cells of the A549 line actualizes the development of ways to use it to increase the effectiveness and reduce the negative effects of radiation therapy.

По причине высокой химической токсичности всех известных радиопротекторов актуальны исследования радиозащитных свойств менее ядовитых соединений. Среди таковых данные свойства признаны для нуклеозида рибоксина (инозина) [1]. И в настоящей работе мы сравнили защитный эффект рибоксина и производного зеленого пигмента хлорофилла – хлорофиллина, о радиозащитных свойствах которого имеются сведения [2, 3].

Мы установили, что при внутрибрюшинном введении их самцам мышей линии ICR (CD-1) в дозировке 100 мкг/г массы тела перед облучением рентгеновским излучением в диапазоне доз 6–7 Гр значение фактора изменения дозы, характеризующего снижение чувствительности организма к ионизирующему излучению, составило для медного хлорофиллина 1,1, а для рибоксина — лишь 1,07. То есть радиопротекторные свойства хлорофиллина более выражены, чем у рибоксина, являющегося признанным радиозащитным соединением.

Авторы [1] сообщают о наличии у рибоксина существенных антиоксидантных свойств, предполагая обусловленность ими радиозащитного эффекта данного вещества. Методом регистрации сопровождающей липидную пероксидацию хемилюминесценции были показаны антиоксидантные свойства и у медного хлорофиллина. На основании этого было выдвинуто предположение, что в механизме радиозащитного действия препаратов на основе хлорофилла важную роль играет подавление метаболизма липидных радиотоксинов и свободно-радикальных реакций, в целом.

При 4-разовом с суточными интервалами введении изучаемых веществ после облучения мышей в дозе 6,5 Гр рибоксин и медный хлорофиллин действительно снизили уровень тиобарбитурат-реактивных продуктов (конечных продуктов липидной пероксидации) в печени.

В проведенном эксперименте по подавлению окислительного стресса, оцененного на основании флуоресценции дихлорфлуоресцеина при нормировании числа клеток при помощи флуорофора Hoechst-33342, в культуре клеток линии A549 аденокарциномы легкого человека рибоксин в микромолярных концентрациях снижал уровень окислительного стресса в облученных рентгеновским излучением в дозе 8 Гр клетках до показателей, характерных для интактных клеток. Однако данного эффекта не наблюдалось при концентрациях рибоксина 1 и 2 мМ.

* Исследование выполнено за счет гранта РНФ (проект № 23-24-00383).

© Л. А. Ромодин, О. В. Никитенко, Т. М. Бычкова, А. А. Московский, 2024

Схожие данные были получены для эталонного антиоксиданта тролокса: снижая уровень окислительного стресса в облученных клетках при концентрациях до 1 мМ до показателей, даже ниже, чем в интактном контроле, при концентрации 2 мМ тролокс показал меньший эффект. Мы считаем, что данные результаты связаны с известным свойством антиоксидантов в некоторых условиях проявлять прооксидантные свойства, обусловленные, например, восстановлением ими Fe^{3+} до Fe^{2+}, вступающего в реакцию Фентона, в ходе которой образуются гидроксильные радикалы.

Провести аналогичный опыт с медным хлорофиллином не удалось, так как он уже в концентрации 500 мкМ приводил к откреплению от субстрата 90 % клеток. Зависимость величины угнетения адсорбционных свойств клеток линии А549 от концентрации хлорофиллина носит экспоненциальный характер.

Таким образом, хлорофиллин, обладающий радиозащитными свойствами, вызвал существенное угнетение раковых клеток линии А549. Полученные результаты актуализируют исследования по разработке способов повышения эффективности и снижения негативных последствий лучевой терапии при использовании хлорофиллина. Возможно, рибоксин также найдет применение в данных терапевтических схемах. Мы планируем провести схожие исследования на других линиях раковых и соматических клеток.

Говоря о рибоксине и хлорофиллине как средстве смягчения лучевого синдрома, перспективным представляется разработка терапевтических схем, предполагающих совместное применение нескольких веществ в различное время до и после облучения.

Литература

1. Гудков С.В., Гудкова О.Ю., Штаркман И.Н. и др. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46 (6). С. 713–718.

2. Kumar S.S., Shankar B., Sainis K.B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo* // Biochimica et biophysica acta. 2004. Vol. 1672(2). P. 100–111.

3. Geric M., Gajski G., Mihaljevic B. et al. Radioprotective properties of food colorant sodium copper chlorophyllin on human peripheral blood cells *in vitro* // Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis. 2019. Vol. 845. P. 403027.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-154

МОЖНО ЛИ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ЗВУК В КАЧЕСТВЕ ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИЛИ УПРАВЛЕНИЯ НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫМ МОРСКИМ БИООБРАСТАНИЕМ?

IS IT POSSIBLE TO USE SOUND AS A TOOL TO CONTROL OR MANAGE UNWANTED MARINE BIOFOULING?

М. А. Савицкий[1], Н. М. Столярчук[2], В. А. Богданович[2], А. В. Кузнецов[2–4]

[1]Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва
[2]Центр дополнительного образования «Малая академия наук», Севастополь
[3]Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь
[4]Севастопольский государственный университет

M. A. Savitskiy[1], N. M. Stolyarchuk[2], V. A. Bogdanovich[2], A. V. Kusnetsov[2–4]

[1]Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy
[2]Center for Additional Education "Small Academy of Sciences", Sevastopol
[3] A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas RAS, Sevastopol
[4]Sevastopol State University

✉ maxxsav37@gmail.com

Аннотация

Проведены исследования воздействия звука на сообщество перифитона Черного моря в искусственных условиях. Применяли широкий диапазон частот (0–30 кГц) и низкую мощность (5 Вт) для генерации звуковых волн. При подаче звука наблюдалось достоверное снижение роста первичных обрастателей. Результаты показывают, что звук можно использовать в качестве низкоэнергетического, нетоксичного и неинвазивного инструмента для борьбы с морским биообрастанием.

Abstract

Studies have been conducted on the impact of sound on the Black Sea periphyton community under artificial conditions. A wide range of frequencies (0–30 kHz) and low power (5 W) were used to generate sound waves. A significant reduction in primary fouling growth was observed under sound exposure. The results offer a potential eco-friendly solution to marine biofouling challenges.

Коммуникация между организмами перифитона включает в себя не только химические сигналы, но и физические, например, звуковые воздействия [1]. В нашей лаборатории проводили исследования механо-чувствительных рецепторов отдельных морских организмов, например, принадлежащих мидиям *Mytilus galloprovincialis* [1], простейшим многоклеточным, как *Mnemiopsis leidyi* [2] и *Trichoplax adhaerens* [3], но резонансные частоты для надмолекулярных сенсоров определить не удалось [4]. Поэтому в работе использовали альтернативный подход, а именно, облучали сообщество организмов-обрастателей широким спектром звуковых частот.

Обрастание поверхностей морскими организмами начинается с бактерий и заканчивается крупными многоклеточными организмами, что необходимо учитывать при разработке средств против обрастания [5]. Сначала к субстрату прикрепляются микроорганизмы, формируя биопленку, затем простейшие, потом микроводоросли, многоклеточные и крупные организмы. В сообществе все они связаны множественными отношениями, в том числе пищевым отношением — хищник-жертва. Тем не менее, коммуникация между организмами перифитона с помощью химических и физических сигналов остается малоизученной.

Эксперименты по исследованию влияния звука на процесс обрастания проводили на базе ФИЦ ИнБЮМ в двух полиэтиленовых ваннах объемом по 20 л, в которых еженедельно осуществляли смену морской воды в т ечение полугода. Одна ванна служила контролем, в другую были погружены 2 звукоизлучателя SFM-27 размером 30 × 16 мм на основе пьезоэлемента, управляемые микроконтроллером на плате Arduino Nano. Частота звука варьировалась дискретно с шагом 1 Гц от 0 до 30 кГц туда и обратно с длительностью на каждой частоте по 10 мс.

Через 6 месяцев непрерывного эксперимента подавление обрастания в опытной ванне стало заметно невооруженным взглядом. Анализ изображений внутренних поверхностей ванн с применением U-критерия Манна — Уитни показал по черно-белому и зеленому каналам статистически значимые различия ($p < 0{,}01$) в обрастании между опытной и контрольной группами.

© М. А. Савицкий, Н. М. Столярчук, В. А. Богданович, А. В. Кузнецов, 2024

Необходимо отметить, что используемая мощность излучателя (5 Вт) значительно меньше, чем в традиционных ультразвуковых установках, вызывающих кавитацию [6, 7]. Наши результаты можно интерпретировать, как слабоэнергетическое воздействие на сообщество организмов-обрастателей, нарушающее связи между биологическими объектами в сообществе. Другой отличительной особенностью проведенного эксперимента был отказ от уникальных звуковых частот, описанных в литературе [8]. Мы использовали широкий набор частот, которые потенциально могут вызывать различные реакции у разных организмов в сумме затрудняющие образование сплоченного сообщества обрастателей.

В итоге, эксперименты показали, что звуковое воздействие может негативно влиять на формирование сообщества морских обрастателей, что позволит глубже понять природу их взаимодействий и предположить возможные пути регулирования данного процесса.

Литература

1. Кузнецов А.В., Петров А.Н., Пиркова А.В., Сергеева Е. В. Структура механорецепции и способность к адгезии у молоди мидии Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819) при воздействии ультразвука // Системы контроля окружающей среды. 2023. № 4(54). С 1–51.

2. Кузнецов А.В., Втюрина Д. Н. Пространственная реконструкция TRPC-механорецепторов гребневика Mnemiopsis leidyi A. Agassiz, 1865 // Молекулярная биология. 2023. Т. 57, № 4. С. 726–735.

3. Kuznetsov A.V., Grishin I.Yu., Vtyurina D. N. Spatial Models of Piezo Proteins and Protein-Protein Interaction Networks in Trichoplax Animals (Placozoa) // Molecular Biology. 2023. Vol. 57, № 5. P. 905–912.

4. Курченко В. М. Выпускная квалификационная работа бакалавра на тему «Сравнение TRP-рецепторов трихоплаксов и человека: механические модели». Севастополь, 2023. 101 с.

5. Amara I., Miled W., Slama R.B., Ladhari N. Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review // Environ Toxicol Pharmacol. 2018. Vol. 57. P. 115–130.

6. Долгопольская М. А. Аксельбанд А. М. Действие ультразвуковых колебаний на организмы морских обрастаний и процесс обрастания // Тр. Севаст. биостанции. 1964. Т. 17. С. 309–324.

7. Неврова Е.Л., Петров А.Н., Мороз Н.А., Касьянов А. Б. Экспериментальное изучение воздействия ультразвука на микроперифитон искусственных субстратов с целью защиты от биопомех систем технического водоснабжения АЭС // Экологическая безопасность прибрежных и шельфовых зон моря. 2023. № 3. С. 98–113.

8. Звягинцев А.Ю., Полтаруха О.П., Масленников С. И. Обрастание морских систем технического водоснабжения и анализ методов защиты от обрастания в водоводах (аналитический обзор) // Вода: химия и экология. 2015. № 1. С. 37–60.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-155

ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ НАТРИЯ И ГЛЮКОЗЫ ВЛИЯЮТ НА РЕЗУЛЬТАТ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА СЛЮНЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ УТОМЛЕНИЯ ОРГАНИЗМА *

CHANGES IN SODIUM ION AND GLUCOSE CONCENTRATIONS AFFECT THE RESULTS OF A BIOLUMINESCENT ANALYSIS OF SALIVA, WHICH IS USED FOR FATIGUE IN THE BODY

М. Р. К. Сальседо, Л. В. Степанова, Г. В. Жукова

Сибирский федеральный университет, Красноярск

M. R. K. Salcedo, L. V. Stepanova, G. V. Zhukova

Siberian Federal University, Krasnoyarsk

✉ slyudmila@mail.ru

Аннотация

Для оценки функционального состояния организма, находящегося в состоянии утомления при многосменном режиме трудовой деятельности, использован биолюминесцентный анализ слюны во взаимосвязи с биохимическими показателями и ионным составом слюны. Показано, что изменения концентраций ионов натрия и глюкозы влияло на результат биолюминесцентного биотеста и позволяют определить наличие или отсутствие утомления работников железнодорожного транспорта.

Abstract

Assessment of the functional state of the body in a state of fatigue during a multi-shift work regime is possible using bioluminescent saliva analysis in relationship with saliva biochemical parameters and the ionic composition. It is shown that changes in sodium ion and glucose concentrations affected the result of the bioluminescent biotest and make it possible to determine the presence or absence of fatigue of railway workers.

Для оценки функционального состояния организма, находящегося в состоянии утомления — переутомления при многосменном режиме трудовой деятельности, предлагается использовать биолюминесцентный метод, в котором влияние слюны на интенсивность биолюминесцентной реакции может указывать на переутомление организма [1–3].

С целью разработки такого метода была исследована слюна специалистов диспетчерского состава Красноярской железной дороги-филиала ОАО «РЖД» (n = 30) обеих полов в течение 5 недель до и после дневной рабочей смены.

Биолюминесцентное тестирование слюны проводили с использованием иммобилизованного многокомпонентного реагента «Энзимолюм» (ООО «НПП «Прикладные биосистемы», Красноярск). Каждый диск реагента содержал ферменты: люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу *Vibrio fischeri*, а также субстраты (тетрадеканаль C_{14} (Sigma, США)) и НАДН (Sigma, США)), совместно иммобилизованные в высушенный крахмальный гель. Реакцию биолюминесценции инициировали добавлением 0,5 мМ водного раствора ФМН (Serva, Германия).

Максимальную интенсивность свечение регистрировали на люминометре GloMax (Promega, Германия). Реакцию биотеста определяли по величине остаточного свечения (Т, %) как отношение средних максимальных интенсивностей свечения экспериментального измерения к контролю, умноженное на 100 %.

Проведен биохимический, ионный и минеральный анализ слюны в образцах, собранных до и после рабочей смены.

В качестве прогнозного критерия было взято наличие или отсутствие общего утомления, которое определяли из анкетных данных.

Статистический анализ данных проведен в программе R. Оптимизация данных выполнена методом главных компонент (PCA). Для улучшения качества предсказаний использовали алгоритм «Random Forest». Уровень значимости $p < 0,05$.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-25-10039) совместно с ККФН, Красноярский край.

© М. Р. К. Сальседо, Л. В. Степанова, Г. В. Жукова, 2024

По результатам биолюминесцентного тестирования слюны, отобранной до начала рабочей смены, исследуемые работники были распределены на две группы: 1-я группа (30 % исследуемых работников) — средняя максимальная интенсивность свечения биотеста под воздействием слюны повышена относительно контрольной люминесценции (135,2 ± 41,0 %), для 2-й группы (70 % исследуемых работников) — понижена (56,1 ± 25,6 %). Средний биолюминесцентный показатель слюны после рабочей смены для работников обеих групп был одинаково понижен (79,4 ± 25,4 %), что указывало на изменение компонентного состава слюны вследствие трудовой нагрузки.

Оптимизация и ранжирование показателей слюны работников обеих групп во взаимосвязи с показателем утомления показало, что важным фактором для общего утомления может являться разница концентраций ионов натрия для работников 1-й группы (утренний тип биологической активности («жаворонок»)) и разница концентраций глюкозы для работников 2-й группы (вечерний тип биологической активности («сова»)). Пограничными значениями перехода работника в состояние «утомлен — не утомлен» для разницы концентраций ионов натрия составило 0,0 г/л и 3,5–4,5 г/л — для концентраций глюкозы.

Таким образом, было показано, что изменения концентраций ионов натрия и глюкозы влияют на результаты биолюминесцентного биотеста и позволяют определить наличие или отсутствие утомления работников железнодорожного транспорта.

Литература

1. Бухтияров И.В., Юшкова О.И., Фесенко М.А., Меркулова А. Г. Оценка риска утомления у работников нервно-эмоционального труда // Анализ риска здоровью. 2018. № 1. С. 66–77.

2. Young M.S., Tabitha S. Rail worker fatigue: identification, management and countermeasures // Proceedings of the institution of mechanical engineers, Part F: Journal of rail and rapid transit. 2017. Vol. 231. P. 1098–1106.

3. Kolenchukova O.A., Dedora A.O., Stepanova L.V. et al. The use of bioluminescent enzyme bioassay for the analysis of human saliva: Advantages and disadvantages // Luminescence. 2024. Vol. 39, № 5: e4776.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-156

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ МОНООКСИДА АЗОТА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ИНИЦИАЦИИ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В ПРИСУТСТВИИ БИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

CHANGES IN THE LEVEL OF NITRIC OXIDE IN HUMAN LYMPHOCYTES UNDER CONDITIONS OF INITIATION OF CELL DEATH PROCESSES IN THE PRESENCE OF BIOGENIC COMPOUNDS

Н. Г. Сараджи, Н. С. Астахов, М. А. Наквасина

Воронежский государственный университет

N. G. Saraji, N. S. Astakhov, M. A. Nakvasina

Voronezh State University

✉ kolya.astakhov.2000@mail.ru

Аннотация

Установлено, что ресвератрол (10^{-7}, 10^{-5} моль/л) и циклоастрагенол (10^{-8}, 10^{-5} моль/л) инициируют значительное увеличение (по сравнению с контролем — отсутствие биогенных агентов) уровня монооксида азота в нативных и модифицированных воздействием пероксида водорода (10^{-5} моль/л) и ультрафиолетовым светом (254 нм, 1510 Дж/м^2) клетках.

Abstract

It has been established that resveratrol (10^{-7}, 10^{-5} mol/L) and cycloastragenol (10^{-8}, 10^{-5} mol/L) initiate a significant increase (compared to control — lack of biogenic agents) in the level of nitric oxide in native and modified by hydrogen peroxide (10^{-5} mol/L) and ultraviolet light (254 nm, 1510 J/m^2) cells.

Важнейший внутри- и межклеточный сигнальный агент — оксид азота (II) — способен оказывать как про-, так и антиоксидантное, цитопротекторное и цитотоксическое действие на клетки в зависимости от его внутриклеточного уровня. Более низкие концентрации монооксида азота способствуют выживанию и пролиферации клеток, а более высокие приводят к остановке клеточного цикла, апоптозу и старению обладает как проапоптическим, так и антиапоптическим действием на клетки [1]. С целью выявления роли оксида азота в процессах регулирования клеточной гибели лимфоцитов исследованы изменения уровня монооксида азота в иммуноцитах в условиях воздействия ультрафиолетового света и пероксида водорода в присутствии ресвератрола и циклоастрагенола, обладающих широким спектром биологической активности.

Установлено (табл. 1), что воздействие ресвератрола в конечных концентрациях 10^{-7}, 10^{-5} моль/л в течение 1 часа на суспензию интактных лимфоцитов с последующей инкубацией при 37 °С (3,5 ч) вызывает статистически значимое повышение уровня продукции монооксида азота по сравнению с таковым для нативных иммуноцитов. Куркин Д. В., Абросимова Е. Е., Бакулин Д. А. и др. [2] полагают, что ресвератрол может активировать сиртуин-1, стимулирующий эндотелиальные NO-синтазы через их деацетилирование и усиление их экспрессии при деацетилировании фактора транскрипции FOXO.

Таблица 1

Исследование изменений уровня NO в лимфоцитах, модифицированных УФ-излучением и пероксидом водорода в присутствии ресвератрола

Уровень продукции NO, мкмоль/л	Конечная концентрация ресвератрола, моль/л		
	0	**10^{-7}**	**10^{-5}**
В интактных клетках	0,0024±0,0001	0,0500±0,0200*	0,040±0,0200*
В H_2O_2-модифицированных клетках	0,0038±0,0015	0,1000±0,0100*	0,0500±0,0030*
В УФ-облученных клетках	0,0034±0,00030	0,1200±0,0020*	0,0600±0,0030*

* — отличия от контроля статистически достоверны.

© Н. Г. Сараджи, Н. С. Астахов, М. А. Наквасина, 2024

Уровень NO в лимфоцитах, подвергнутых воздействию ультрафиолетового света и пероксида водорода, в присутствии ресвератрола в тех же концентрациях, существенно возрастает по отношению к величинам исследуемого параметра для клеток, модифицированных в отсутствие полифенола.

Обнаружено (табл. 2), что воздействие циклоастрагенола в конечных концентрациях 10^{-8}, 10^{-5} в течение 1 часа на суспензию интактных лимфоцитов с последующей инкубацией при 37 °С (3,5 ч) вызывает статистическое значимое повышение уровня продукции монооксида азота по сравнению с таковым для нативных иммуноцитов.

Таблица 2

Исследование изменений уровня NO в лимфоцитах, модифицированных УФ-излучением и пероксидом водорода в присутствии циклоастрагенола

Уровень продукции NO, мкмоль/л	Конечная концентрация циклоастрагенола, моль/л		
	0	**10^{-8}**	**10^{-5}**
В интактных клетках	0,0026±0,0002	0,0321±0,0060*	0,0207±0,0050*
В H_2O_2-модифицированных клетках	0,0029±0,0001	0,0500±0,0030*	0,0343±0,0050*
В УФ-облученных клетках	0,0034±0,0006*	0,0500±0,0030*	0,0390±0,0200*

* — отличия от контроля статистически достоверны.

Уровень NO в лимфоцитах, подвергнутых воздействию ультрафиолетового света и пероксида водорода, в присутствии циклоастрагенола в тех же концентрациях, существенно возрастает по отношению к величинам исследуемого параметра для клеток, модифицированных в отсутствии сапонина.

Обнаружено повышение уровня оксида азота в лимфоцитах после воздействия немодифицированных и модифицированных серебряных наночастиц по отношению к таковому для интактных иммуноцитов. При использовании цитрат-стабилизированных сверхнизких частот отмечается тенденция к снижению концентрации монооксида азота по сравнению с таковой для клеток, обработанных немодифицированными наночастицами.

Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу представления о важнейшей роли оксида азота в осуществлении процессов клеточной гибели лимфоцитов человека, индуцированной воздействием ультрафиолетового света, пероксида водорода, серебряных наночастиц. Ресвератрол и циклоастрагенол могут быть использованы в качестве агентов, регулирующих уровень этого сигнального агента в иммуноцитах, а также интенсивность процессов клеточной гибели.

Литература

1. Рязанцева Н. В., Старикова Е. Г., Таширева Л. А. и др. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза // Цитология. 2012. Т. 54, № 2. С. 105–111.

2. Куркин Д. В., Абросимова Е. Е., Бакулин Д. А. и др. Модуляция активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции // Фармация и фармакология. 2022. Т. 10, № 2. С. 130–153.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-157

ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСА TRIM27-USP7-PML В СОСТАВЕ ЯДЕРНЫХ PML-ТЕЛЕЦ *

PROPERTIES OF THE TRIM27-USP7-PML COMPLEX WITHIN NUCLEAR PML-BODIES

С. А. Силонов[1], Е. Ю. Смирнов[1], Е. А. Шмидт[1,2], А. В. Фонин[1], И. М. Кузнецова[1], К. К. Туроверов[1]

[1] *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*
[2] *Санкт-Петербургский государственный университет*

S. A. Silonov[1], E. Y. Smirnov[1], E. A. Shmidt[1,2], A. V. Fonin[1], I. M. Kuznetsova[1], K. K. Turoverov[1]

[1] *Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg*
[2] *Saint Petersburg State University*

✉ silonovsa25@yandex.ru

Аннотация

В работе изучена локализация и функциональная роль комплекса белков TRIM27, USP7 и PML. Используя методы конфокальной микроскопии и биоинформатического анализа, показано существование стабильного комплекса TRIM27-USP7-PML и продемонстрировано, что около 25 % белков-партнеров TRIM27 взаимодействуют с PML и USP7, причем основная функция этой группы связана с негативной регуляцией транскрипции ДНК.

Abstract

This study investigates the localization and functional role of the TRIM27, USP7, and PML protein complex. Utilizing confocal microscopy techniques and bioinformatic analysis, we demonstrate the existence of a stable TRIM27-USP7-PML complex. Furthermore, we show that approximately 25 % of TRIM27 protein partners interact with PML and USP7, with the primary function of this group being associated with negative regulation of DNA transcription.

В последние годы накапливается все больше данных о существенной роли белка TRIM27 в возникновении и развитии ряда злокачественных заболеваний, включая лейкозы, рак груди, колоректальный рак, рак почек, пищевода и легких. Более того, TRIM27 был связан с такими заболеваниями как волчаночный нефрит и болезнь Паркинсона [1]. TRIM27, известный также как белок 27, содержащий трехчастный (трехсторонний) мотив (TRIM), представляет собой многофункциональную убиквитин E3-лигазу, участвующую в различных клеточных процессах, таких как: пролиферация, апоптоз и регуляция иммунных реакций [2]. Деубиквитинирующим ферментом белка TRIM27 является убиквитин-специфическая протеаза 7 (USP7), при этом TRIM27 стабилизируется путем связывания с USP7, а образующийся белковый комплекс TRIM27-USP7 может играть существенную роль в стабильности генома через широкую сеть взаимодействий с другими белками, включая PML, p53, Mdm2 и TPP1 [3]. Стоит отметить, что TRIM27 может взаимодействовать с белком промиелоцитарного лейкоза PML, образуя гетеродимеры, однако детали этого взаимодействия остаются малоизученными. Изоформы белка PML локализуются преимущественно в PML-тельцах, многофункциональных полирегуляторных динамических ядерных немембранных органеллах.

Целью исследования было изучение колокализации и динамических характеристик TRIM27, USP7 и изоформ PML в составе PML-телец с использованием конфокальной микроскопии, а также сравнение интерактомов этих белков биоинформатическими методами.

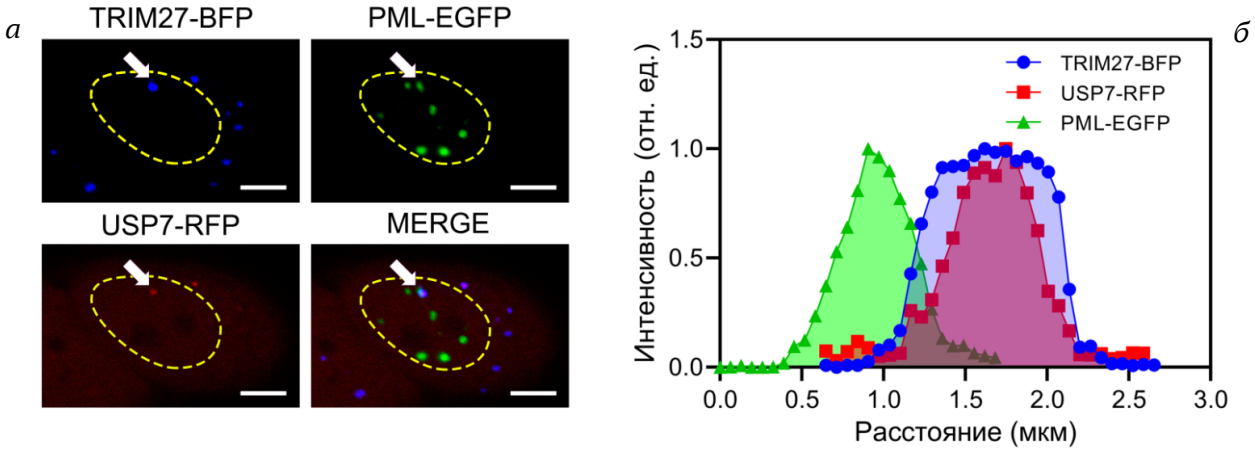
Биоинформатический анализ включал в себя анализ базы данных BIOGRID для выявления белок-белковых взаимодействий TRIM27, USP7, PML и функциональный анализ генов с использованием подхода Gene Ontology (GO). Для изучения колокализации были применены экспериментальные методы, включающие создание нокаутных по собственному гену PML клеточных линий U2OS и A549, получение линий со стабильной экспрессией TRIM27 и USP7 (TRIM27-BFP, TRIM27-GFP, USP7-RFP), а также применение методов конфокальной микроскопии (FRET, FRAP) для изучения взаимодействий и динамических характеристик белков.

Согласно анализу интерактома, около 25 % белков TRIM27 взаимодействуют с PML и USP7. При этом основная роль этой группы белков определена как отрицательная регуляция транскрипции ДНК (GO:0045892). Эти данные подчеркивают важность изучаемого комплекса в регуляции транскрипции и его потенциальную роль в онкогенезе.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-15-00429) и стипендии Президента Российской Федерации № СП-5364.2022.4.

© С. А. Силонов, Е. Ю. Смирнов, Е. А. Шмидт, А. В. Фонин, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, 2024

Экспериментальные данные продемонстрировали, что нокаут PML приводит к изменениям в количестве и локализации белка TRIM27, но не влияет на его динамические характеристики. Стоит отметить, что при образовании комплекса TRIM27-USP7-PML в линии A549 нокаутной по PML (см. рисунок) наблюдается полная иммобилизация TRIM27 и USP7, что указывает на стабильность этого комплекса и его потенциальную функциональную значимость. Среди изученных изоформ PML выявлена специфическая роль ряда изоформ в стабилизации комплекса с TRIM27 и USP7.



Локализация комплекса TRIM27-BFP, PML-EGFP и USP7-RFP в нокаутной по PML клеточной линии A549 (*а*) и анализ совместной локализации (*б*). *Стрелкой* показан комплекс белков TRIM27, PML и USP7. *Желтая пунктирная линия* соответствует ядру. Масштабная линейка — 5 мкм

Полученные результаты подтверждают существование комплекса TRIM27-USP7-PML и его важность в регуляции транскрипции. Биоинформатический анализ согласуется с экспериментальными данными, указывая на широкую сеть взаимодействий TRIM27 с PML и USP7. Выявленная роль этой группы белков в негативной регуляции транскрипции может объяснять их участие в различных заболеваниях.

Литература

1. Yu C. et al. Emerging roles of TRIM27 in cancer and other human diseases // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022. Vol. 10. P. 1004429.

2. Garcia-Garcia J. et al. TRIM27 is an autophagy substrate facilitating mitochondria clustering and mitophagy via phosphorylated TBK1 // The FEBS journal. 2023. Vol. 290, №. 4. P. 1096–1116.

3. Jung J.U., Cobb M.H. WNK1 controls endosomal trafficking through TRIM27-dependent regulation of actin assembly // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2023. Vol. 120, № 25: e2300310120.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-158

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИБРОТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В МОДЕЛИ ПРЕДСЕРДНОЙ ТКАНИ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КАРДИОМИОЦИТОВ ПАЦИЕНТА

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FIBROTIC LESIONS IN THE ATRIAL TISSUE MODEL IN TERMS OF ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE PATIENT'S CARDIOMYOCYTES

А. П. Синицына[1], А. К. Бережной[1,2], М. М. Слотвицкий[1–3], А. Г. Демин[2], А. Г. Зубов[2], В. А. Цвелая[1–3], К. И. Агладзе[1,3]

[1]Московский физико-технический институт, Долгопрудный
[2]Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург
[3]Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского

A. P. Sinitsyna[1], A. K. Berezhnoy[1,2], M. M. Slotvitsky[1–3], A. G. Demin[2], A. G. Zubov[2], V. A. Tsvelaya[1–3], K. I. Agladze[1,3]

[1]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
[2]ITMO University, Saint Petersburg
[3]Moscow Regional Scientific Research Clinical Institute named after M. F. Vladimirsky

✉ sinitsyna.ap@phystech.edu

Аннотация

Фибрилляция предсердий (ФП) — одно из наиболее опасных сердечно-сосудистых заболеваний. Терапия ФП медикаментами часто оказывается неэффективной при длительном течении заболевания из-за изменения в электрофизиологии предсердных клеток. В данной работе исследовалась аритмогенность ткани предсердия с фиброзными участками в зависимости от электрофизиологических свойств кардиомиоцитов пациента, в том числе под действием антиаритмического препарата.

Abstract

Atrial fibrillation (AF) is one of the most dangerous cardiovascular diseases. AF therapy with medications often proves ineffective in the long-term course of the disease due to changes in the electrophysiology of atrial cells. In this work, we studied the arrhythmogenicity of atrial tissue with fibrous regions depending on the electrophysiological properties of the patient's cardiomyocytes, including under the action of an antiarrhythmic drug.

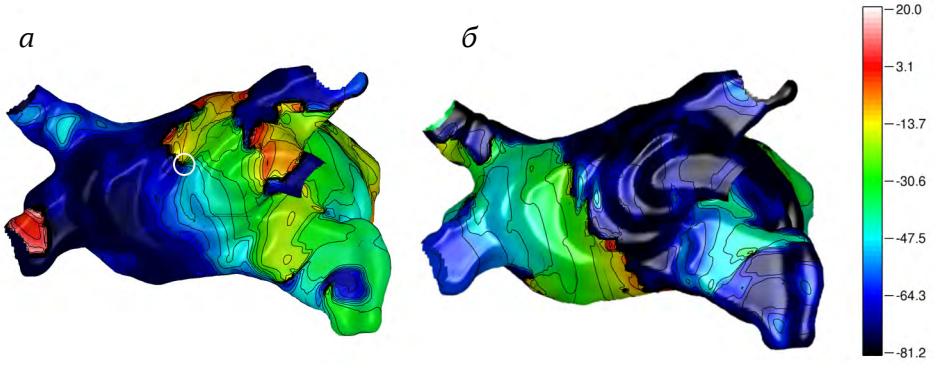
По данным Всемирной организации здравоохранения сердечно-сосудистые заболевания занимают первое место в мире по количеству летальных исходов среди всех категорий взрослого населения [1]. Фибрилляция предсердий (ФП), в свою очередь, является опасным заболеванием, связанным с высоким риском внезапной смерти или инвалидизации пациента. Основными причинами возникновения аритмий считаются структурная неоднородность миокарда и очаги фиброза. Одним из способов терапии нарушений ритма является применение препаратов, влияющих на работу ионных каналов и электрофизиологию кардиомиоцитов. Однако медикаменты могут быть неэффективны при разных формах течения заболевания. Для прогнозирования эффективности препаратов *in vitro* создаются модели тканей, воспроизводящие различные нарушения проводимости миокарда. В то же время, компьютерное моделирование уже сейчас является удобным предсказательным инструментом, который позволяет проводить эксперименты по поиску патологий проведения на виртуальной копии предсердия пациента [2].

При создании модели фиброза у пациентов с персистирующей формой ФП возникает вопрос, как различия в электрофизиологии ткани при разном течении заболевания влияют на медикаментозное лечение. В данной работе исследовалась аритмогенность ткани предсердия с фиброзными участками в зависимости от электрофизиологических свойств кардиомиоцитов пациента, в том числе под действием антиаритмического препарата (Верапамил).

Трехмерная модель левого предсердия получалась посредством реконструкции снимков МРТ пациента с контрастом гадолиния. Сегментация снимка проводилась по стенке предсердия и пулу крови. Сегментация фиброзных очагов не производилась, форма и локализация фиброза варьировалась при проведении эксперимен-

© А. П. Синицына, А. К. Бережной, М. М. Слотвицкий, А. Г. Демин, А. Г. Зубов, В. А. Цвелая, К. И. Агладзе, 2024

тов, и в итоге была выбрана так, чтобы вероятность возникновения аритмии на в окрестности фиброзных очагов была высокой. Затем набор изображений переводился во входные данные для OpenCarp — среды для моделирования волновой динамики. Для воспроизведения правильной картины распространения волн было необходимо восстановить направление сердечных волокон предсердия. Для данной цели использовался открытый инструмент AugmentA. По нескольким опорным точкам, фиксирующим расположение клапанов, вен и ушка предсердия, выстраивалась локальная карта волокон. В основу симуляции проведения импульса легла электрофизиологическая модель Contermanche [3], которая хорошо описывает аритмогенные процессы в ткани предсердий. Для повышения точности предсказания здоровой ткани и участкам фиброза присваивались различные значения проводимости, основанные на экспериментальных данных. Для воссоздания эффекта препарата варьировались параметры модели, такие как быстрый ионный ток натрия (INa), калицевый ток L-типа (ICa-L), частота пульсовой стимуляции и т. д.



Активационные карты проведения в восстановленном предсердии с фиброзом при использовании модели с электрофизиологией длительной ФП: *а* — без воздействия медикаментов (фибрилляция); *б* — при воздействии антиаритмика Верапамила (нормальная картина проведения в ткани)

В работе рассматривались две модели электрофизиологии кардиомиоцитов: нормальная [3] и модель с имитацией ремоделированной предсердной ткани пациента с персистирующей формой ФП [2]. Во втором случае частично ингибированы калиевые ионные токи (IKs, IKur), а также кальциевый ток L-типа (ICa-L). Оба случая модифицировались с учетом действия на ткань антиаритмика Верапамила, блокирующего некоторые ионные каналы. Для вызова фибрилляции в модели, частота стимуляции постепенно повышалась, достигая предельного значения в 250 уд./мин. В результате показано, что применение исследуемого вещества (Верапамила) при наличии длительных эпизодов ФП у пациентов оказывает положительное воздействие и снижает риски возникновения аритмии при наличии очагов фиброза в ткани (см. рисунок). В то же время в модели фиброза с нормальной электрофизиологией Верапамил оказался малоэффективен для устранения фибрилляции предсердий.

Литература

1. Lippi G., Sanchis-Gomar F., Cervellin G. Global epidemiology of atrial fibrillation: an increasing epidemic and public health challenge // International Journal of Stroke. 2021. Vol. 16(2). P. 217–221.

2. Boyle P.M. e al. Computationally guided personalized targeted ablation of persistent atrial fibrillation // Nat. Biomed. Eng. 2019. Vol. 3(11). P. 870–879.

3. Courtemanche M., Ramirez R. J., Nattel S. Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 1998. Vol. 275(1). P. H301–H321.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-159

ГИПОКСИЯ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ КИСЛОРОД-ТРАНСПОРТНОГО ОБМЕНА *

ROLE OF HYPOXIA IN REGULATING THE OXYGEN-TRANSPORT FUNCTION OF RBC

О. В. Слатинская, Н. А. Браже, Г. В. Максимов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

O. V. Slatinskaya, N. A. Brazhe, G. V. Maksimov

Lomonosov Moscow State University

✉ slatolya@mail.com

Аннотация

Структурные изменения цитоплазмы эритроцита («краудинг») регулируют объем эритроцитов при гемодинамике и их кислород-транспортную функцию. Состояния гипоксии вызывают изменение упорядоченности молекул гемоглобина в цитоплазме, конформации гема и глобина. Что оказывает существенное влияние на жесткость мембраны и кислород-транспортную функцию эритроцитов.

Abstract

Structural changes of erythrocyte cytoplasm («crowding») regulate the volume of RBC cells during hemodynamics and their oxygen-transport function. Hypoxia conditions states cause a change in the ordering of hemoglobin molecules in cytoplasm, conformations of heme and globin. This affect the elasticity of RBC's membrane and oxygen-carrying function of RBC.

Адаптационные механизмы, направленные на снижение повреждающего эффекта гипоксии, имеют важное физиологическое значение. Кроме того, состояния гипоксии при заболеваниях сопровождаются нарушением баланса между потребностью клеток в O_2 и его доставкой к тканям. Известно, что молекулы гемоглобина (Гб), которые составляют основой компонент цитоплазмы эритроцитов, обладают высокой степенью сродства к лигандам (O_2, CO_2, NO_x) и чувствительностью к парциальному давлению кислорода в среде. Изменения конформации Гб и состояния мембраны эритроцита служат маркером для определения типа заболевания и ее степени тяжести при заболеваниях. Современные представления об изменениях конформации и функции белков в цитоплазме клеток («макромолекулярный краудинг»), указывают на то, что молекулы должны формировать упорядоченную структуру и образовывать комплексы, что может оказывать влияние на конформацию молекул и способность Гб связывать лиганды в цитоплазме и растворе. В связи с этим, разрабатываются подходы оценки состояния эритроцитов *in vitro*, с использованием таких методов, как спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) и ее разновидности, инфракрасная спектроскопия, лазерная интерференционная микроскопия, а также ряд стандартных биохимических методов.

Нами показано, что в условиях гипоксии происходит увеличение ζ –потенциала плазматической мембраны эритроцита. Использование модифицирующих веществ (снижение концентрации экстраклеточного Ca^{2+}, увеличение доли воды в цитоплазме клетки) приводит к увеличению ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита на 1,5 ± 0,3 мВ при отсутствии изменения морфологии клетки. Методом КР-спектроскопии было показано, что изменение ζ -потенциала сопровождается увеличением вероятности куполообразной конформации гема в цитоплазме эритроцита, что характеризует снижение погружения атома железа в плоскость порфиринового макроцикла, в результате, возрастает способность Гб связывать и выделять лиганды (5–15 %). Метод поляризационной КР-спектроскопии выявил существенные изменения конформации гема и плотности упаковки глобина, при отсутствии изменения в распределении и ориентации молекул гемоглобина в цитоплазме эритроцита. С помощью ИК- и КР-спектроскопии установлено, что увеличение вероятности нахождения гема в куполообразной конформации сопровождается снижением плотности упаковки глобина Гб. Доклиническое исследование эритроцитов пациентов с идиопатической легочной гипертензией (ИЛГ) показали, что конформация цитоплазматического и мембраносвязанного Гб в норме и при патологии различна. В норме, увеличение вероятности куполообразной конформации гема сопровождается увеличением плотности упаковки, а при патологии наблюдается обратная зависимость – увеличение куполообразной конформации гема сопровождается снижением плотности

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-74-00006).

© О. В. Слатинская, Н. А. Браже, Г. В. Максимов, 2024

упаковки глобина. Кроме того, при заболеваниях липосомального накопления снижается величина соотношения (I_{1580} / I_{1550}, I_{1580} / I_{1375}), что характеризует увеличение доли гема в куполообразной конформации в пробе [1]. Вероятно, на способность Гб связывать и переносить кислород в цитоплазме эритроцита оказывают существенное влияние изменения конформации гема и плотность упаковки молекулы глобина, а также, гетерогенность распределения Гб в цитоплазме клетки. Отметим, что снижение ζ -потенциала плазматической мембраны эритроцита снижением содержания экстраклеточного Ca^{2+} у пациентов с ИЛГ сопровождается увеличением доли куполообразной конформации гема при отсутствии выраженных изменений в глобине Гб. Таким образом, увеличение жесткости мембраны эритроцитов, характерное для пациентов с ИЛГ [2] и их продолжительное пребывание в условиях гипоксии вызывает снижение подвижности глобина, что препятствует связыванию O_2 с гемом за счет увеличения вклада пиррольных колец гемопорфирина и валентных колебаний групп винилов.

Литература

1. Semenova A.A., Semenov A.P. et al. Nanostructured silver materials for noninvasive medical diagnostics by surface-enhanced Raman spectroscopy // Mendeleev communications. 2016. Vol. 26. P. 177–186.

2. Allakhverdiev E.S., Rezukhina E.A. et al. Assessment of the effectiveness of PAH-specific therapy, including selexipag, in patients with idiopathic pulmonary hypertension according to a comprehensive examination using raman spectroscopy // *Евразийский кардиологический журнал*. 2023. Vol. 4. P. 56–63.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-160

РЕГИСТРАЦИИ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ МОЛЕКУЛ NADH В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ *

REGISTRATION AND MATHEMATICAL MODELING OF THE NADH PHOTOBLEACHING DYNAMICS IN CARDIAC TISSUE FOR THE INDICATION OF ISCHEMIC DAMAGE

М. М. Слотвицкий[1–3], А. К. Бережной[1,2], Т. О. Сергеева[1,2], С. А. Романова[2], Р. С. Шайдулина[4], В. А. Цвелая[1–3], К. И. Агладзе[2,3]

[1] *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*
[2] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[3] *Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского*
[4] *Альметьевский государственный нефтяной институт*

M. M. Slotvitsky[1–3], A. K. Berezhnoy[1,2], T. O. Sergeeva[1,2], S. A. Romanova[2], R. S. Shaidulina[4], V. A. Tsvelaya[1–3], K. I. Agladze[2,3]

[1] *ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[3] *M. F. Vladimirsky Moscow Regional Clinical Research Institute*
[4] *Almetyevsk State Oil Institute*

✉ mikhail.slotvitskiy@phystech.edu

Аннотация

В работе мы предлагаем новый подход к неинвазивной детекции ишемии сердечной ткани. В качестве источника информации используется нелинейная динамика флуоресценции молекул NADH под действием постоянного возбуждающего излучения. Это позволяет в реальном времени получать карту ишемических очагов, а также разделять обратимые и необратимые стадии ишемических повреждений.

Abstract

In this study, we propose a new approach to noninvasive detection of cardiac tissue ischemia. The nonlinear dynamics of NADH molecules fluorescence changes under the influence of constant exciting light is used as a source of information. This allows us to obtain a map of ischemic regions in real time, as well as to separate reversible and irreversible stages of ischemic damage.

Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) достигает почти половины от общего количества смертей в развитых странах [1]. Одним из наиболее эффективных способов лечения терминальных стадий ССЗ остается трансплантация донорского органа, возможность которой ограничивается дефицитом донорских сердец. Одной из основных причин дефицита является то, что около 60 % сердец оказываются непригодными для пересадки, в том числе по причине возникновения функциональных повреждений на стадии тепловой ишемии (до извлечения сердца) и холодовой ишемии (время транспортировки в кардиоплегическом растворе) [1, 2]. Наличие таких повреждений может привести к непредсказуемым послеоперационным аритмиям и отторжению сердца (не связанным с несовместимостью по HLA-гену) [2].

Известно, что соотношение концентраций молекул NAD^+ и NADH является надежным маркером ишемии (доля NADH варьируется от 22 % в норме до 80 % при ишемии [3]), однако биохимические методы оценки требуют инвазивных манипуляций с клетками, исключая возможность последовательных измерений: альтернативой служит оптическая оценка автофлуоресценции молекул NADH в ткани (fNADH) [4]. Простота регистрации fNADH компенсируется сложностью интерпретации: с одной стороны, оптическая регистрация не дает представления о текущем значении концентрации NAD^+, а с другой, абсолютное значение fNADH при неизменной концентрации NADH неустойчиво к изменениям мощности поглощаемого тканью возбуждающего излучения и фотообесцвечиванию (перехода NADH в NAD^+ при поглощении фотонов [5]).

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 24-21-00162).

© М. М. Слотвицкий, А. К. Бережной, Т. О. Сергеева, С. А. Романова, Р. С. Шайдулина, В. А. Цвелая, К. И. Агладзе, 2024

Одна из попыток решить описанные проблемы была предпринята группой M. W. Kay [4]: авторы использовали фотообесцвечивание, чтобы сдвинуть баланс NAD^+:NADH в большую сторону, тем самым запустив работу фермента дегидрогеназы (осуществляющей переход, обратный результирующей реакции фотообесцвечивания, переводя избыточный NAD^+ обратно в NADH) для оценки продукции NADH в реальном времени — данный метод позволил качественно отделить случаи холодовой ишемии и реперфузии изолированного крысиного сердца. Целью нашей работы было построение точной количественной оценки ишемических повреждений; для этого мы разработали математическую модель, описывающую баланс концентраций NADH и NAD^+ при фотообесцвечивании и результирующей работе дегидрогеназы. Теоретическая часть работы позволила сделать два вывода: 1) изменение fNADH во времени нелинейным образом зависит как от начальных концентраций NADH и NAD^+, так и от активности дегидрогеназы; 2) обратная задача имеет единственное решение — форма сигнала fNADH позволяет однозначно определить баланс NADH и NAD^+ при произвольной мощности поглощаемого возбуждающего излучения. Возможность использовать произвольное значение мощности позволило перейти от качественной оценки к количественной. Оба вывода были проверены в серии экспериментов на изолированных крысиных сердцах и монослоях человеческих кардиомиоцитов, полученных направленной дифференцировкой из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Полученные результаты могут быть полезны как для фундаментального изучения процессов ишемического повреждения, так и для практического применения с построением карт ишемии сердец, находящихся на сохранении в кардиоплегическом растворе во время транспортировки или длительных операций на открытом сердце.

Литература

1. McCartney S.L., Patel C., Del Rio J. M. Long-term outcomes and management of the heart transplant recipient // Best practice & research Clinical anaesthesiology. 2017. Vol. 31, № 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, № 3. P. 406–413.

3. Scholz T.D. et al. Effect of substrate on mitochondrial NADH, cytosolic redox state, and phosphorylated compounds in isolated hearts // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1995. Vol. 268. № 1. P. H82–H91.

4. Moreno A. et al. Enzyme-dependent fluorescence recovery of NADH after photobleaching to assess dehydrogenase activity of isolated perfused hearts // Scientific Reports. 2017. Vol. 7, № 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 et al. // Biophysical journal. 2004. Vol. 86, № 1. P. 629–645.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-161

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФИЛЬ КРЫС OXYS-МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

THE EFFECT OF MELATONIN ON THE METABOLIC PROFILE OF OXYS RATS-A MODEL OF SPORADIC FORM OF THE ALZHEIMER'S DISEASE

А. А. Смоленцев[1,3], О. А. Снытникова[1], Н. Г. Колосова[2], Д. В. Телегина[2], Ю. П. Центалович[1]

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

A. A. Smolentsev[1,3], O. A. Snytnikova[1], N. G. Kolosova[2], D. V. Telegina[2], Y. P. Tsentalovich[1]

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

✉ a.smolentsev3@g.nsu.ru

Аннотация

Мелатонин является перспективным лекарственным или профилактическим препаратом при болезни Альцгеймера (БА). В работе проведен сравнительный количественный метаболомный анализ коры головного мозга и сыворотки крови крыс OXYS — модели преждевременного старения, одной их характерных черт модели является развитие комплекса признаков характерных для БА. В работе использован метод ЯМР спектроскопии.

Abstract

Melatonin is a promising drug or prophylactic drug for Alzheimer's disease (AD). The paper presents a comparative quantitative metabolomic analysis of the cerebral cortex and blood serum of OXYS rats — a model of premature aging. A features of this model is the development of a complex of signs characteristic of AD. The method of NMR spectroscopy is used in the work.

Метаболомные исследования являются важными для понимания патогенеза различных заболеваний, так как позволяют определять количественные концентрации биологически важных низкомолекулярных соединений — метаболитов. Эта информация позволяет определить молекулярные механизмы различных патологий и выявить их потенциальные биомаркеры. Животные модели являются экспериментальными моделями заболеваний человека и необходимы для изучения влияния различных препаратов на патогенез заболевания. Животные модели также нужны для изучения механизмов биохимических процессов, протекающих в норме и при патологии. Болезнь Альцгеймера (БА) — самое распространенное нейродегенеративное заболевание, которое приводит к снижению когнитивных функций и потере памяти в пожилом возрасте. Причиной этому являются необратимые изменения в головном мозге, приводящие к гибели нейронов. Не существует эффективных лекарств и средств профилактики БА, однако мелатонин является потенциально перспективным кандидатом на эту роль, так как он обладает регуляторными, нейропротекторными, антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Использование животной модели — крыс OXYS, для которых характерны все ключевые патогенетические и «клинические» признаки БА, позволяет изучать влияние мелатонина на протекание заболевания.

В работе метод ЯМР применяется для метаболомного профилирования коры головного мозга и сыворотки крови с целью выявления изменений в метаболизме, вызванных терапевтическим действием мелатонина. Используются группа крыс OXYS, принимавших мелатонин, группа крыс OXYS, не принимавших мелатонин, и группа крыс Wistar в качестве контроля. Определено 44 метаболита в коре головного мозга и 55 метаболитов в сыворотке крови. Для них установлены диапазоны варьирования и средние значения концентраций. Установлено, что метаболомный профиль коры головного мозга слабо зависит от линии крыс, а также не претерпевает значительных изменений вследствие приема мелатонина. Тем не менее, было обнаружено различие в метаболических путях между группами крыс Wistar и OXYS, не принимавшими мелатонин: различаются пути метаболизма таурина и гипотаурина, а также биосинтез убихинона и других терпеноидов-хинонов. Установлено, что метаболомный

© А. А. Смоленцев, О. А. Снытникова, Н. Г. Колосова, Д. В. Телегина, Ю. П. Центалович, 2024

профиль сыворотки крови крыс чувствителен к приему мелатонина. Значительно отличаются концентрации аргинина и метионин сульфоксида у крыс OXYS, принимавших и не принимавших мелатонин. Эти метаболиты могут быть показателями нормальной работы систем, регулирующих окислительный стресс, воспалительные процессы и включения нейропротекторных механизмов. Между крысами OXYS, принимавшими и не принимавшими мелатонин, значимые различия обнаружились в нескольких метаболических путях. Этими путями являются метаболизм фруктозы и маннозы, метаболизм аминосахаров и нуклеотидных сахаров, а также метаболизм аргинина и пролина. Эти изменения могут свидетельствовать об изменении энергетического метаболизма и включении антиоксидантной регуляции вследствие приема мелатонина.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-162

РЕАКЦИИ НА ВВЕДЕНИЕ КОНВУЛЬСАНТА ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛА У КРЫС С РАЗНОЙ ТЯЖЕСТЬЮ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

REACTIONS TO THE ADMINISTRATION OF THE CONVULSANT PENTYLENTETRAZOLE IN RATS WITH VARYING SEVERITY OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

М. Р. Субханкулов, О. Е. Зубарева

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

M.R Subkhankulov, O. E. Zubareva

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ mara_sub@mail.ru

Аннотация

Работа посвящена поиску электрофизиологических и поведенческих показателей тяжести эпилептических нарушений в литий-пилокрпиновой модели височной эпилепсии.

Abstract

This work is devoted to the search for electrophysiological and behavioral indicators of the severity of epileptic disorders in the lithium-pilocrine model of temporal lobe epilepsy.

Эпилепсия — тяжелое нервно-психическое заболевание, характеризующееся развитием спонтанных судорог. Около 30 % людей, страдающих эпилепсией, имеет фармакорезистетную форму болезни, что актуализирует поиск новых лекарственных препаратов. Для изучения и тестирования потенциальных медикаментов необходима экспериментальная модель заболевания. Одной из лучших моделей височной эпилепсии (ВЭ) является литий-пилокарпиновая модель, так как она воспроизводит большинство клинических и невропатологических особенностей человеческой ВЭ. Одним из основных критериев тяжести эпилепсии в данной модели является частота спонтанных рецидивирующих судорог (СРС), она варьирует у разных животных от нескольких приступов в день до одного припадка в неделю, что делает оценку частоты СРС очень трудоемкой. Поэтому актуальным является поиск дополнительных показателей, позволяющих судить о тяжести эпилептических нарушений в модели ВЭ. В человеческой практике золотым стандартом исследований при оценке тяжести эпилепсии является запись электроэнцефалограммы (ЭЭГ) и оценка выраженности на записи ЭЭГ эпилептиформных паттернов — спайков, спайк-волн и полиспайков. Также в клинической практике могут применяться функциональные нагрузки, облегчающие выявление эпилептиформной активности (например, депривация сна). При работе с животными для таких целей может быть использовано введение низких доз конвульсантов.

Данное исследование было проведено для отработки методики определения тяжести состояния крыс с височной эпилепсией на основе оценки их реакции на введение низких доз конвульсанта пентилентетразола по поведенческим и электрофизиологическим характеристикам.

Височную эпилепсию (ВЭ) индуцировали у крыс самцов Вистар введением пилокарпина через сутки после введения хлорида лития. Контрольным крысам пилокарпин не вводили. Через 6-7 месяцев проводилась операция по установке платформы для последующей записи ЭЭГ. Чрез 5 дней после операции осуществлялась запись ЭЭГ и видеомониторинг поведения в различных условиях: первый день — фоновая ЭЭГ (1 час), второй день — ЭЭГ (1 час) после введения низких доз конвульсанта пентилентетразола (ПТЗ, 40 мг/кг). Через 3 недели после введения ПТЗ осуществлялся 48-часовой видеомониторинг свободного поведения экспериментальных крыс для выявления СРС. При последующем анализе сформированы группы СРС(+) и СРС(–), у которых соответственно обнаружены или не обнаружены СРС.

Частота спайков на ЭЭГ в фоне не отличалась между группами. После введения пентилентетразола (ПТЗ) у некоторых животных (45 % контрольных и 71 % экспериментальных) появлялись тонико-клонические судороги, которые сопровождались иктакльной активностью на ЭЭГ, животные из контрольной и экспериментальной групп не отличались по частоте появления тонико-клонических судорог. Латентный период до появления первых тонико-клонических судорог был короче у крыс с ВЭ (СРС(+) и СРС(–)) по сравнению с контрольными жи-

© М. Р. Субханкулов, О. Е. Зубарева, 2024

вотными. Кроме того, введение ПТЗ вызвало появление миоклонических вздрагиваний (не сопровождавшейся иктальной активностью на ЭЭГ) у всех контрольных и экспериментальных крыс, латентное время их появления было меньше у группы СРС(–) по сравнением с контрольной группой. Частота отдельных спайков после введения пентилентетразола резко увеличилась у животных с ВЭ (СРС(+) и СРС(–)), но не у контрольных животных. Оценка динамики частоты спайков после введения ПТЗ показала, что в группе СРС(+) отмечается более длительное повышение частоты спайков (с 50-й по 60-ю минуту после введения ПТЗ достоверное увеличение частоты спайков по сравнению с контролем отмечается только у крыс СРС(+)). Отработанная методика позволяет более точно оценить состояние нервной системы крыс с ВЭ. Она может быть рекомендована при проведении фармакологических исследований.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-163

РАЗРАБОТКА ГИБРИДНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ НА ПОВЕРХНОСТИ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ ДЛЯ РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛИ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА *

DESIGN OF HYBRID SYSTEMS BASED ON MAGNETIC NANOPARTICLES WITH FOLIC ACID-MODIFIED SERUM ALBUMIN IMMOBILIZED ON THE SURFACE FOR RECEPTOR-MEDIATED DELIVERY TO TUMORS AND PHOTOSENSITIZER

А. В. Торопцева[1], М. Г. Горобец[1], Д. С. Хачатрян[1,3], М. И. Абдуллина[1], А. В. Колотаев[3], М. А. Градова[2], В. А. Золотцев[4], А. В. Бычкова[1]

[1]*Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*
[2]*Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва*
[3]*Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва*
[4]*НИИ биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва*

A. V. Toroptseva[1], M. G. Gorobets[1], D. S. Khachatryan[1,3], M. I. Abdullina[1], A. V. Kolotaev[3], M. A. Gradova[2], V. A. Zolottsev[4], A. V. Bychkova[1]

[1]*Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow*
[2]*N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS, Moscow*
[3]*National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*
[4]*V. N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry RAS, Moscow*

✉ stropdiva@yandex.ru

Аннотация

Проведены серии работ, нацеленные на получение наноструктур, включающих магнитные наночастицы (МНЧ) и сывороточный альбумин (ЧСА), модифицированный N-гидроксисукцинимидным эфиром фолиевой кислоты (мФК), фотосенсибилизатором пирофеофорбида А (ПфА), N-гидроксисукцинимидным эфиром пирофеофорбида А(эПфА). Получены стабильные и агрегативно устойчивые наносистемы„ модифицированные фолиевой кислотой и фотосенсибилизатором

Abstract

A series of works aimed at obtaining nanostructures including magnetic nanoparticles (MNPs) and serum albumin (HSA) modified with N-hydroxysuccinimide ester of folic acid (mFA), photosensitizer pyropheophorbide A (PpA), N-hydroxysuccinimide ester of pyropheophorbide A(ePpA) have been carried out. Stable and aggregation stable nanosystems were produced.

На сегодняшний день создано и исследовано огромное множество вариаций гибридных систем для адресной доставки лекарственных веществ (ЛВ), в том числе на основе магнитных наночастиц (МНЧ). Безусловно, их актуальность связана с широким спектром диагностических и терапевтических применений: опухолевая гипертермия, магнитно-резонансные исследования [1], тканевая инженерия [2] и адресная доставка лекарств [3].

Для обеспечения рецептор-опосредованной доставки ЛВ к клеткам-мишеням, таким как раковые клетки яичек и яичников [4], меланомы, носоглотки [5] и молочной железы [6], гибридную систему функционализируют фолиевой кислотой (ФК). Указанный биовектор необходим для пролиферации, рецепторы к его остаткам экспрессируются несколькими видами опухолей, при этом количество ФК-связывающих рецепторов на поверхности раковых клеток отдельных клеточных линий существенно превышает таковое для нормальных клеток.

Функциональность и агрегативная устойчивость системы в физиологических условиях достигается благодаря созданию на поверхности МНЧ инертных и биоразлагаемых покрытий, модифицированных лекарственными или векторными молекулами. В настоящей работе, в качестве покрывающего агента использовался человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), поскольку он препятствует нежелательной адсорбции компонентов крови, увеличивает биосовместимость наносистемы, способен снижать токсичность различных ЛВ и обеспечивать их транспорт [7].

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-75-10150).

© А. В. Торопцева, М. Г. Горобец, Д. С. Хачатрян, М. И. Абдуллина, А. В. Колотаев, М. А. Градова, В. А. Золотцев, А. В. Бычкова, 2024

В ходе текущей работы апробированы и реализованы три стратегии получения систем на основе магнитных наночастиц, покрытых сывороточным альбумином, конъюгированным с эфиром фолиевой кислоты (мФК). Стратегия (рис. 1), включающая последовательное получение устойчивого и целостного покрытия из ЧСА и связывание с мФК, показала себя наиболее перспективной для дальнейшей работы. Были созданы агрегативно устойчивые и модифицированные наноструктуры с включенным в состав покрытия белком, количество которого на финальном этапе стратегии составило 107 ± 32 мкг на 1 мг МНЧ.

Одним из известных подходов воздействия на опухолевые клетки является фотодинамическая терапия (ФДТ). Осуществление указанного подхода происходит за счет транспорта фотосенсибилизатора, например, гибридной системой к клетке-мишени с последующим воздействием света определенной длины волны на агент.

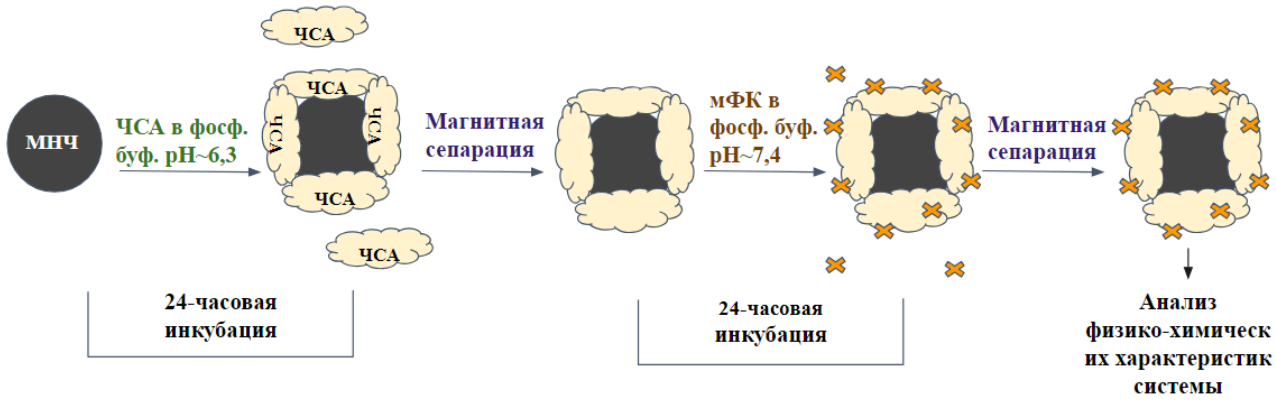


Рис. 1. Стратегия получения наносистем с покрытием и функциональным компонентом

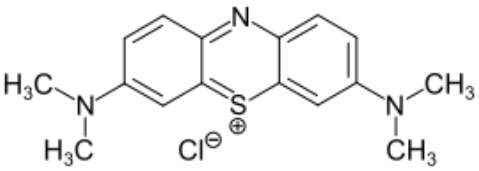


Рис. 2. Структурная формула фотосенсибилизатора метиленового синего

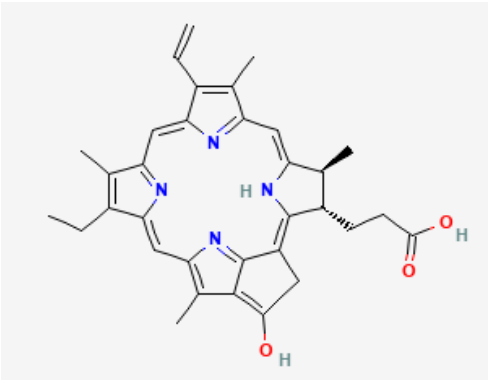


Рис. 3. Структурная формула фотосенсибилизатора пирофеофорбида А

Ранее полученные нами гибридные системы показали себя перспективными носителями метиленового синего (рис. 2) при его нековалентном связывании с МНЧ, покрытыми ЧСА.

В рамках настоящей работы в качестве фотосенсибилизатора был использован пирофеофорбид А(ПфА) (рис. 3), поскольку он активно применяется в терапии целевых клеточных линий (например, в MCF-7[8] и MDA-MB-231[9]) и обладает низкой цитотоксичностью в отсутствие света. Исходя из вышеуказанной информации, задачей текущей работы было связывание ПфА **нековалентно** с поверхностью наночастиц и **ковалентно** с сывороточным альбумином за счет применения стратегии, идентичной по этапам конъюгации мФК.

В ходе работы совокупностью физико-химических методов проводилось описание следующих характеристик системы:

1. Устойчивость и целостность покрытия путем добавления к системе иммуноглобулина G с последующим анализом систем для ПфА-содержащих систем и мФК-содержащих систем с применением методик, разработанных в работе [10].
2. Изменение гидродинамического диаметра систем с помощью метода динамического светорассеяния (ДСР).
3. Связывание мФК и ПфА методом спектроскопии в УФ- и видимой областях качественно и количественно.
4. Способность ЧСА к десорбции с поверхности МНЧ с применением ЧСА, конъюгированного с флуоресцентным красителем Cyanine5.

Литература

1. Avasthi A. et al. Magnetic nanoparticles as MRI contrast agents // Surface-modified Nanobiomaterials for Electrochemical and Biomedicine Applications. 2020. P. 49–91.

2. Nabavinia M., Beltran-Huarac J. Recent progress in iron oxide nanoparticles as therapeutic magnetic agents for cancer treatment and tissue engineering // ACS Applied Bio Materials. 2020. Vol. 3, № 12. P. 8172–8187.

3. Swetha K.L., Roy A. Tumor heterogeneity and nanoparticle-mediated tumor targeting: the importance of delivery system personalization // Drug Delivery and Translational Research. 2018. Vol. 8, № 5. P. 1508–1526.

4. Akal Z.U., Alpsoy L., Baykal A. Superparamagnetic iron oxide conjugated with folic acid and carboxylated quercetin for chemotherapy applications // Ceramics International. 2016. Vol. 42, № 7. P. 9065–9072.

5. Young O. et al. Folate Receptor as a Biomarker and Therapeutic Target in Solid Tumors // Current Problem Cancer. 2023. Vol. 47. P. 100917.

6. Toffoli G. et al. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers // International Journal of Cancer. 1997. Vol. 74, № 2. P. 193–198.

7. Elzoghby A.O., Samy W.M., Elgindy N.A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems // Journal of Controlled Release. 2012. Vol. 157, № 2. P. 168–182.

8. Hoi S.W.H. et al. Photodynamic Therapy of Pheophorbide a Inhibits the Proliferation of Human Breast Tumour via Both Caspase-dependent and-independent Apoptotic Pathways in In Vitro and In Vivo Models // Phytotherapy Research. 2012. Vol. 26, № 5. P. 734–742.

9. Bui-Xuan N. H. et al. Photo-activated pheophorbide-a, an active component of Scutellaria barbata, enhances apoptosis via the suppression of ERK-mediated autophagy in the estrogen receptor-negative human breast adenocarcinoma cells MDA-MB-231 // Journal of ethnopharmacology. 2010. Vol. 131, № 1. P. 95–103.

10. Bychkova A. V. et al. The influence of pH and ionic strength on the interactions between human serum albumin and magnetic iron oxide nanoparticles //International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 194. P. 654–665.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-164

СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МОЛЕКУЛ NO^+ В СИСТЕМЕ ПОНИЖАЕТ ЦИТО- И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ NA-НИТРОПРУССИДА ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ДИТИОНИТОМ NA НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MCF-7

A DECREASE IN THE NUMBER OF NO^+ MOLECULES IN THE SYSTEM REDUCES THE CYTO- AND GENOTOXICITY OF NA-NITROPRUSSIDE DURING THE REDUCTION OF NA DITHIONITE ON MCF-7 CELL CULTURE

Н. Е. Трифонова[1], Е. И. Некрасова[2],
В. А. Тронов[1], А. Ф. Ванин[1]

[1] *Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва*
[2] *Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*

N. E. Trifonova[1], E. I. Nekrasova[2],
V. A. Tronov[1], A. F. Vanin[1]

[1] *N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS, Moscow*
[2] *N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow*

✉ natalia.trifonova@chph.ras.ru

Аннотация

Одним из доноров NO является нитропруссид натрия (SNP). SNP также проявляет цитотоксическое и генотоксическое действие. Цитотоксичность его во многом связана с продукцией катиона нитрозония (NO^+), который высвобождаются при его метаболизме. Генотоксичность SNP проявлялась как способность SNP индуцировать мутации в генах. В работе исследуется влияние SNP на ДНК клеток MCF-7 и оценивается вклад иона нитрозония в цито- и генотоксичность.

Abstract

One of the NO donors is sodium nitroprusside (SNP). SNP also exhibits cytotoxic and genotoxic effects. Its cytotoxicity is largely related to the production of nitrosonium cation (NO^+), which is released during its metabolism. The genotoxicity of SNP was manifested as the ability of SNP to induce mutations in genes. The paper investigates the effect of SNP on the DNA of MCF-7 cells and evaluates the contribution of nitrosonium ion to cyto- and genotoxicity.

Цели и задачи: провести исследование цито- и генотоксичности SNP и оценить вклад NO^+ на клетках MCF-7.

Материалы и методы

Реактивы: синтетический донор NO, нитрозильный комплекс железа с меркаптосукцинатом (ДНКЖ-МС), синтезирован в нашей лаборатории и хранился в виде концентрированного раствора при −20 °С. Кристаллы SNP и SDT (Sigma-Aldrich, США) хранились при −20°С и растворялись непосредственно перед использованием в инкубационной среде. Оценку цитотоксичности проводили путем измерения снижения метаболической активности клеток с помощью МТТ-теста, основанного на определении активности NAD(P)-зависимых дегидрогеназ [1]. Целостность клеточной мембраны оценивали с использованием стандартной методики двойного окрашивания флуоресцентными красителями [2].

Генотоксичность и цитотоксичность взаимосвязаны через способность повреждения ДНК индуцировать гибель клетки, в процессе которой происходит ферментативная деградация клеточной ДНК. Для регистрации этого и обратного процесса репарации ДНК, мы использовали метод ДНК-комет, параллельно отслеживая морфологические изменения в клетках и образование ДНК-комет, поскольку погибшие и погибающие клетки формируют определенный тип ДНК-комет, известный как кометы-ежики [3]. Применялся нейтральный вариант метода комет [4]. Клетки, фиксированные на предметных стеклах, подвергали лизису при нейтральном pH и электрофорезу, после чего полученные изображения ДНК-комет и их распределение по параметру поврежденности ДНК анализировали в отдельных клетках [5].

© Н. Е. Трифонова, Е. И. Некрасова, В. А. Тронов, А. Ф. Ванин, 2024

Результаты и их обсуждение

Горизонтальная линия на графиках (см. рисунок) отражает уровень повреждения ДНК в клетках mt = 30. В интактной популяции 83 % клеток находятся в фазе G0/G1 клеточного цикла [6] (слева от вертикальной линии), 17 % представлены клетками в S+G2/M-фазах цикла (справа от вертикальной линии); в популяции обработанной SNP это 80 и 20 %.



Двупеременные распределения в плоскости координат — флуоресценция комет (ось *X*) и повреждение ДНК (ось *Y*) экспериментальных точек, полученных для интактных клеток, *N* = 1070 (*а*) и после 90 мин инкубации с SNP 100 мкМ, *N* = 992 (*б*); под ними рассчитанные из этих распределений частотные распределения клеток по интенсивности их флуоресценции (содержанию ДНК в них, Мс); *в* — частотные гистограммы распределения по поврежденности ДНК (mt) в интактных клетках (серые, mt = 12) и в инкубированных с SNP (черные, mt = 27); по средним показателям распределения достоверно различаются $p < 0,05$, СКС

В результате инкубации с SNP 100 мкМ в течение 90 минут, доля клеток, получивших двунитевые разрывы (ДР) ДНК, достигает 25-30%. Это может быть вызвано апоптозом, инициируемым нитропруссидом через митохондрии и генотоксичностью самого SNP как донора NO^+, более цитотоксичного по сравнению с NO [7, 8]. Для определения вклада NO^+ в образование ДР в ДНК использовался эффект структурной перестройки SNP под действием дитионита натрия (SDT), преобразующего SNP из донора NO^+ в донора только NO. В их взаимодействия образуется ДНКЖ с тиосульфатом, с меньшим количеством NO^+, что приводит к снижению генотоксичности SNP.

Заключение

Морфологические изменения в клетках под действием SNP представляют характерную деградацию ядерной ДНК. Генотоксичность SNP не зависит от стадии клеточного цикла, поскольку доли поврежденных клеток в разных стадиях приблизительно одинаковы: 29 ± 7% и 27 ± 6 %. В результате 90 мин инкубации с SNP 100 мкМ доля клеток, получивших сильные повреждения в виде ДР ДНК, составляет 25–30 %, что близко доле нежизнеспособных клеток по результатам МТТ-теста на 24 и 48 ч инкубации (22 ± 4 %). Это позволяет связать раннее накопление ДР ДНК и цитотоксический эффект SNP на клетках MCF-7.

Восстановление SNP сопровождается его распадом и образованием М-ДНКЖ с тиосульфатом. Такие комплексы могут выступать донорами NO и NO^+, что определяет частичное сохранение цитотоксичности. Добавление SDT к SNP достоверно снижало мембранную цитотоксичность. МТТ-тест показал, что цитотоксичность микса SNP и SDT ниже суммы цитотоксичностей компонентов смеси, измеренных по отдельности, что говорит о снижении цитотоксичности от взаимодействия компонентов смеси. Снижение количества молекул NO^+ в системе достоверно снижало генотоксичность SNP, что подтвердилось методом ДНК-комет по выходу ДР ДНК в клетках MCF-7. Невозможно полностью снять цитотоксическое действие NO^+, входящего в состав SNP, путем его одноэлектронного восстановления до NO из-за способности живых организмов образовывать при участии ионов Fe^{2+} и молекул NO — ДНКЖ, всегда присутствующие в организмах.

Литература

1. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity // Journal of Immunological Methods. 1983. Vol. 16 (1-2). P. 55–63.

2. Atale N. et al. Cell-death assessment by fluorescent and non-fluorescent cytosolic and nuclear staining techniques // Journal of Microscopy. 2014. P. 1–13.

3. Chandna S. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death // Cytometry PartA. 2004. Vol. 61A. P. 127–133.

4. Тронов В.А., Некрасова Е.И. Повреждение ДНК и белка p53 ограничивают пролиферацию клеток Мюллера в сетчатке мышей в ответ на действие метилнитрозомочевины // Биофизика. 2020. Т. 65, № 3. С. 543–551.

5. Tronov V.A., et al. Geno- and cytotoxic action of dinitrosyl iron complex with mercaptosuccinate on MCF-7 cells // Cell and Tissue Biology. 2023. Vol. 17, № 1. P. 48–55.

6. Nunez R., Garay N., Villafane C., Bruno A., Lindgren V. Description of a flow cytometry approach based on SYBR-14 staining for the assessment of DNA content, cell cycle analysis, and sorting of living normal and neoplastic cells // Experimental and Molecular Pathology. 2004. Vol. 76, № 1. P. 29–36.

7. Vanin A.F., et al. Polynuclear water-soluble dinitrosyl iron complexes with cysteine or glutathione: electron paramagnetic resonance and optical studies // NitricOxide – Biol.Chem. 2011. Vol. 23. P. 136.

8. Ванин А.Ф., Ткачев Н. А. Динитрозильные комплексы железа с тиол-содержащими лигандами как источники универсальных цитотоксинов — катионов нитрозония // Биофизика. 2023. Т. 68. С. 329–340.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-165

МЕХАНОХИМИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ КРАХМАЛА И СУБМИКРОННЫХ ВОЛОКОН ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ *

MECHANOCHEMICAL PRODUCTION OF NANOSIZED STARCH PARTICLES AND SUBMICRON CELLULOSE FIBERS FOR THE CREATION OF INNOVATIVE VETERINARY DRUGS

Д. Е. Тряхов[1], Е. А. Тареева[2], А. А. Ворошнина[1], С. В. Леонов[2], А. А. Политов[1]

[1]Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск
[2]Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН, р. п. Краснообск, Новосибирская область

D. E. Tryakhov[1], E. A. Tareeva[2], A. A. Voroshnina[1], S. V. Leonov[2], A. A. Politov[1]

[1]Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, Novosibirsk
[2]Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Siberian Federal Research Centre of Agro-BioTechnologies RAS, Krasnoobsk, Novosibirsk Region

✉ tryakhovd@gmail.com

Аннотация

В работе предлагаются новые механохимические и механо-ферментативные методы выделения нанокристаллических крахмалов (НКК) и субмикронных волокон целлюлозы (МІС). На основе полученных наночастиц в качестве адъювантов были приготовлены и испытаны вакцины от Ньюкаслской болезни птиц. Предложенные методы являются экологически безопасными и на их основе может быть создано малотоннажное производство адъювантов.

Abstract

The paper proposes new mechanochemical and mechano-enzymatic methods for isolating nanocrystalline starches (SNC) and submicron cellulose fibers (MIC). Based on the obtained nanoparticles, vaccines against Newcastle disease of birds were prepared and tested as adjuvants. The proposed methods are environmentally safe and can be used to create low-tonnage production of adjuvants.

Отсутствие современных отечественных вакцин, необходимых для вакцинации птицы, требует разработки новых отечественных адъювантов. Предлагаемые в настоящее время отечественные носители представляют собой наноразмерные частицы соединений алюминия, которые имеют большую скорость оседания и часто вызывают воспаление у животных вследствие отторжения частиц оксида алюминия тканями живого организма. В литературе рассматриваются адъюванты, на основе наночастиц природных биополимеров, таких как крахмал, целлюлоза и некоторых других [1]. Вакцины, изготовленные на их основе, не имеют перечисленных недостатков, однако получение наноразмерных стабильных частиц занимает много времени. Следовательно, для замены наночастиц оксида алюминия на наночастицы углеводов требуется снизить время и затраты на получение наночастиц крахмала, целлюлозы и других природных полимеров. Для адъювантов на основе НКК требуется получение кристаллических частиц амилопектина, которые стабильны в организме и допускают стерилизацию при высоких температурах. Предлагаемый метод в литературе основан на кислотном гидролизе нативного крахмала в течении 5 суток. Нами был разработан метод предварительной физико-химической обработки нативного крахмала, который позволяет сократить время получения НКК до 24 часов. При этом, размер частиц составляет 100–200 нм, а выход частиц 20 % [2].

Для стабилизации частиц в растворе требуется, чтобы наночастицы обладали высоким ζ-потенциалом, порядка 30 мВ. Для этой цели частицы подвергались химической модификации. После этого на полученные образцы наносили модельный белок бычий альбумин и изучалась его сорбционная емкость в сравнении с имеющимися на рынке неорганическими наночастицами гидроксида и ортофосфата алюминия. Результаты приведены на рис. 1.

Как видно из приведенных результатов, сорбционная емкость химически модифицированного крахмала вдовое выше, чем емкость применяемых в ветеринарной практике соединений алюминия.

* Работа выполнена в рамках государственного задания ИХТТМ СО РАН (проект № 122011700261-3).

© Д. Е. Тряхов, Е. А. Тареева, А. А. Ворошнина, С. В. Леонов, А. А. Политов, 2024

Вторым перспективным адъювантом является наноразмерная и субмикронная целлюлоза. Нами был предложен механо-ферментативный метод получения наноразмерной волокон целлюлозы, полученный из коммерческой хлопковой целлюлозы. Химическая модификация волокон позволяла достигнуть величины ζ-потенциала, равного −16 + 25 мВ. Была приготовлена субмикронная и наноразмерная целлюлоза (МІС) с поверхностным ζ-потенциалом −16 мВ, и химически модифицированная МІС-С с поверхностным ζ-потенциалом +25 мВ. На основе данных образцов изготовлены ряд экспериментальных вакцинных препаратов и один классический препарат на основе полимерного адъюванта Montanide ISA 70VS (Seppic, Нидерланды), по рецепту, регламентированному производителем 70/30 (полимер/водный раствор антигена). Все экспериментальные вакцинные препараты изготавливались на основе 0,5 % раствора целлюлозы. В качестве антигена использовали живую вакцину против Ньюкаслской болезни из штамма Ла-Сота «Авивак-НБ» («Авивак», Россия). Вирус инактивировали прогревани-

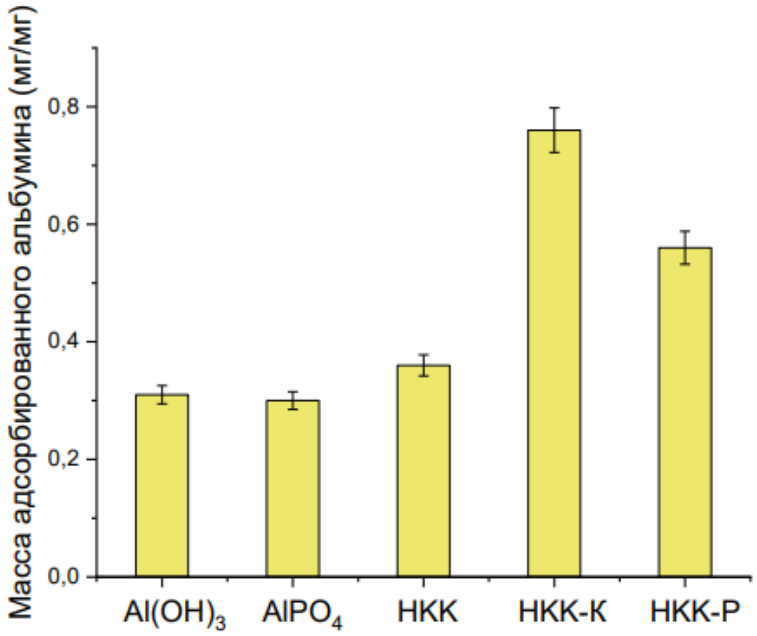


Рис. 1. Количество сорбированного альбумина на неорганические частицах и на частицах нанокристаллического крахмала. НКК — наноразмерный крахмал, (НКК-К) катионный (НКК-Р) и анионный модифицированные нанокрахмалы

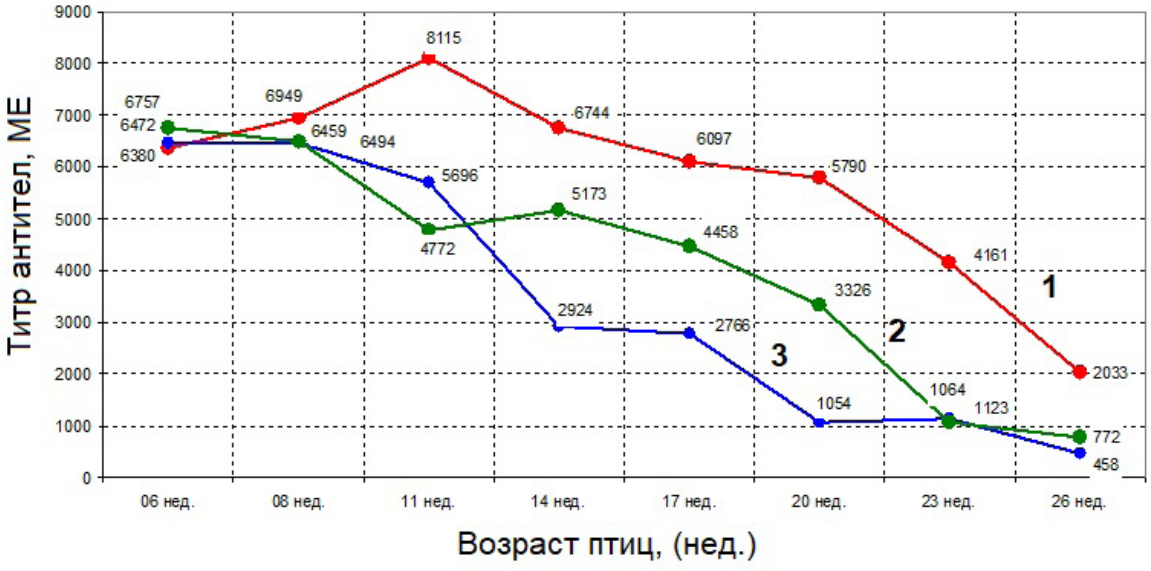


Рис. 2. Динамика титра антител вакцинированной птицы к Ньюкаслской болезни (тест-система BioChek): *1* — вакцина на Montanid ISA 70VS; *2* — вакцина на 0,5 % МІС (рецепт 70/30); 3 — вакцина на 0,5 % МІС-С (рецепт 70/30)

ем. Во всех образцах вакцинных препаратов итоговая концентрация антигена (вируса штамма Ла-Сота) соответствовала 4 lg ЭИД50/мл. Результаты испытания представлены на рис. 2.

Таким образом, разработаны новые методики получения наноразмерных кристаллических частиц крахмала и целлюлозы и показана перспективность их использования в качестве адъювантов для получения вакцины для птицы. Полученная вакцина MIC может быть рекомендована для вакцинации цыплят-бройлеров.

Литература

1. Sachiko Kaihara Nitta and Keiji Numata. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering // Int. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14. P. 1629–1654.

2. Tryakhov D.E., Politov A.A Chemical-mechanical Treatment of Potato starch for Isolation of Nanocrystal Particles // Chim. Tecno Acta. 2022. Vol. 9 (3). P. 20229313.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-166

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРОТОКОЛОВ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ФИБРОБЛАСТОВ В КАРДИОМИОЦИТЫ С ПОМОЩЬЮ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ

DEVELOPMENT OF NEW PROTOCOLS FOR CHEMICAL TRANSDIFFERENTIATION OF FIBROBLASTS INTO CARDIOMYOCYTES USING BIOINFORMATICS PREDICTION OF SIGNALING PATHWAYS

Е. А. Турчанинова, А. А. Аитова, С. А. Романова, С. Г. Коваленко, В. А. Цвелая, М. М. Слотвицкий, К. И. Агладзе

Московский физико-технический институт, Долгопрудный

E. A. Turchaninova, A. A. Aitova, S. A. Romanova, S. G. Kovalenko, V. A. Tsvelaya, M. M. Slotvitsky, K. I. Agladze

Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ turchaninova.ea@phystech.edu

Аннотация

Электрические волны передаются в сердечной ткани возбудимыми клетками — кардиомиоцитами. Чрезмерное содержание фибробластов может препятствовать распространению электрических сигналов. Представленная работа посвящена разработке протоколов химической трансдифференцировки фибробластов в кардиомиоциты. Работа представляет собой новый потенциальный вариант применения регенеративной медицины в области сердечно-сосудистых заболеваний.

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 protocols for the chemical transdifferentiation of fibroblasts into cardiomyocytes. This work represents a new potential application of regenerative medicine in the field of cardiovascular disease.

Нарушение нормального режима распространения электромеханических волн возбуждения в сердечной ткани может стать причиной сердечной аритмии, асинхронных сердечных сокращений и даже способно привести к остановке сердца. Электромеханические волны возбуждения передают возбудимые клетки сердца, кардиомиоциты. В результате ишемии или других патологий они могут замещаться непроводящими клетками, фибробластами. Чрезмерное содержание фибробластов в сердечной ткани мешает распространению волн возбуждения по сердечной ткани, такие нарушения называют фиброзом.

Работа посвящена разработке протоколов химической трансдифференцировки фибробластов напрямую в кардиомиоциты для уменьшения фибротических повреждений сердечной ткани. Осуществление прямого репрограммирования без стадий эмбрионального клеточного развития позволит осуществить новые подходы в области терапии фиброзных изменений сердца. Основной целью работы было создание новых протоколов трансдифференцировки из фибробластов в кардиомиоциты с повышенной эффективностью и проверкой функциональности получаемых клеток. В задачи работы входили подбор и постановка контрольных протоколов трансдифференцировки для фибробластов животных, их последующая модификация и разработка протоколов трансдифференцировки для фибробластов человека на основе контрольных.

Полученные в ходе трансдифференцировки кардиомиоциты были проанализированы с точки зрения функциональной и электрофизиологической зрелости, протоколы апробированы для мышиных, крысиных и человеческих фибробластов. Работа представляет собой новый потенциальный вариант применения регенеративной медицины в области сердечно-сосудистых заболеваний.

Литература

1. Mohamed T. M. A., Stone N. R., Berry E. C. et al. MD Chemical Enhancement of In Vitro and In Vivo Direct Cardiac Reprogramming // 2016.

© E. A. Turchaninova, A. A. Aitova, S. A. Romanova, S. G. Kovalenko, V. A. Tsvelaya, M. M. Slotvitsky, K. I. Agladze, 2024

2. Burridge P. W., Matsa E., Shukla P. et al. Chemically Defined and Small Molecule-Based Generation of Human Cardiomyocytes // 2014

3. Lian X., Zhang J., Azarin S. M., Zhu K. et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/β-catenin signaling under fully defined conditions // 2013

4. Burridge P. W., Matsa E., Shukla P. et al. Chemically Defined Generation of Human Cardiomyocytes

5. Lai P., Lin H., Chen S. et al. Efficient Generation of Chemically Induced Mesenchymal Stem Cells from Human Dermal Fibroblasts // 2017

6. Greaney J., Subramanian G. N., Ye Y., Homer H. Isolation and in vitro Culture of Mouse Oocytes // Bio-protocol. 2021. Vol. 11 (15).

7. Fu Y., Huang C., Xu X. et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails // Cell Research. 2015. Vol. 25(9). P. 1013–1024.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-167

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА G-КВАДРУПЛЕКСА HTEL-22 С КАТИОННЫМ ПОРФИРИНОМ МЕТОДАМИ ЭПР И ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

INVESTIGATION OF THE HTEL-22 G-QUADRUPLEX COMPLEX WITH CATIONIC PORPHYRIN BY EPR AND OPTICAL SPECTROSCOPY METHODS

Т. А. Хлынова, Н. Э. Санникова, М. И. Колоколов, О. А. Крумкачева

Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет

T. A. Khlynova, N. E. Sannikova, M. I. Kolokolov, O. A. Krumkacheva

International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

✉ t.khlynova@g.nsu.ru

Аннотация

В работе предложен метод лазерно-индуцированной дипольной ЭПР спектроскопии для анализа комплексов ДНК G-квадруплексов с фотосенсибилизаторами, важных для фотодинамической терапии. Исследование теломерных G-квадруплексов с фотолигандом TMPyP4 показало структурные изменения под воздействием света, включая раскрытие квадруплекса и формирование димеров. Работа демонстрирует перспективность ЭПР-спектроскопии в изучении подобных комплексов.

Abstract

The study introduces laser-induced dipolar EPR to analyze G-quadruplex DNA complexes with photosensitizers, crucial in photodynamic therapy. The investigation of telomeric G-quadruplexes with the TMPyP4 photoligand showed structural changes upon light exposure, including G-quadruplexes unfolding and the formation of dimers. This method enhances our understanding of G-quadruplex interactions, demonstrating EPR's value in examining these complexes.

Теломераза — фермент, отвечающий за сохранение теломерных концов хромосом, укорачивающихся в ходе клеточного деления. Активность теломеразы не проявляется в соматических клетках, однако, была обнаружена ее высокая экспрессия в раковых образованиях. В качестве потенциального решения в лечении онкологических заболеваний было предложено ингибировать активность теломеразы посредством стабилизации G-квадруплексов (G4) при связывании с лигандами. Катионные порфирины являются хорошо изученными лигандами за счет их высокой селективности к G4. Также порфирины активно применяются в терапии как фотосенсибилизаторы (ФС), способные генерировать активные формы кислорода при возбуждении в триплетное состояние. Взаимодействие с лигандами и воздействие света способно приводить к структурным изменениям в G-квадруплексах. Поэтому для успешного терапевтического применения необходимо исследовать структуру комплекса G4 с катионным порфирином и ее изменения в результате фотолиза.

Однако, в силу высокой полиморфности G-квадруплексов возникает проблема исследования их структуры из-за присутствия нескольких конформаций в образце. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) является информативным методом исследования структуры биополимеров. Двойной электрон — электронный резонанс (DEER, PELDOR) является одним из вариантов импульсного ЭПР, с помощью которого можно извлекать распределение по расстояниям в диапазоне 1,5–10 нм между стабильными спиновыми метками. Недавно предложенная методика лазер-индуцированной магнитной дипольной спектроскопии (LaserIMD) позволяет измерять расстояния между спиновой меткой и фотовозбужденным триплетным состоянием фотосенсибилизатора. Ранее такой подход не применялся в исследовании нуклеиновых кислот и комплексов ФС с G-квадруплексами.

Таким образом, целью работы являлось продемонстрировать возможность применения метода ЭПР для выявления структурных аспектов образования комплексов порфиринов с олигонуклеотидами на примере HTel-22 / TMPyP4 (мезо-тетра(N-метил-4-пиридил) порфирин). Для достижения поставленной цели решались следующие задачи: установление структуры G-квадруплекса HTel-22 и ее изменения при связывании с лигандом TMPyP4, выявление изменения структуры HTel-22 при фотолизе комплекса с TMPyP4.

© Т. А. Хлынова, Н. Э. Санникова, М. И. Колоколов, О. А. Крумкачева, 2024

В ходе работы [1] была впервые продемонстрирована возможность применения импульсной ЭПР спектроскопии для исследования структуры комплексов фотоактивных молекул с G4. Также определена локализация фотолиганда TMPyP4 в комплексе с HTel-22. Показано, что в результате фотолиза комплекса HTel-22 / TMPyP4 происходит разрушение G-квадруплексов и увеличение доли димерных структур с 16±5% до 36±5% для концентраций 0,1 мМ HTel-22 и 0,2 мМ TMPyP4.

Литература

1. Sannikova N. E., Kolokolov M. I., Khlynova T. A. et al. Revealing light-induced structural shifts in G-quadruplex-porphyrin complexes: a pulsed dipolar EPR study // Physical Chemistry Chemical Physics. 2023. Vol 25(33). P. 22455–22466.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-168

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПЛАТФОРМ С ПОМОЩЬЮ СОВМЕЩЕННЫХ *IN SILICO* МЕТОДОВ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ СЕРДЦА

ADVANCED CARDIOVASCULAR TOXICITY SCREENING: INTEGRATING HUMAN IPSC-DERIVED CARDIOMYOCYTES WITH *IN SILICO* MODELS

В. А. Цвелая[1–3], А. К. Бережной[1–3], А. П. Синицына[1], И. С. Семидетнов[1], В. Д. Наумов[1], М. М. Слотвицкий[1–3]

[1]*Московский физико-технический институт, Лаборатория биофизики возбудимых систем, Долгопрудный*
[2]*Университет ИТМО, Санкт-Петербург*
[3]*Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского*

V. A. Tsvelaya[1–3], A. K. Berezhnoy[1–3], A. P. Sinitsyna[1], I. S. Semidetnov[1], V. D. Naumov[1], M. M. Slotvitsky[1–3]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*ITMO University, Saint Petersburg*
[3]*M. F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute*

✉ vts93@yandex.ru

Аннотация

Фармацевтическая промышленность активно развивается в области создания новых скрининг платформ для тестирования сердечной безопасности *in vitro* с использованием кардиомиоцитов, полученных путем дифференцировки из человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или hiPSC (hiPSC-CM). Традиционный тест на кардиотоксичность представляет собой ее зависимость от удлинения интервала QT как основного маркера кардиотоксичности. Однако, в последние годы такой тест, как единственный верный, подвергается сомнению. Кроме того, существует ряд инициатив, например, инициатива Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA), которые рекомендуют использовать компьютерное моделирование и платформы *in silico* в качестве более комплексного подхода к тестированию кардиотоксичности в сочетании со скринингом веществ на hiPSC-CM *in vitro*. Наше исследование представляет такую совмещенную инновационную платформу, которая интегрирует тестирование кардиотоксичности на тканево-инженерной модели из hiPSC-CM *in vitro* с моделями *in silico* для более полной оценки кардиотоксичности веществ. Используя электрофизиологические и морфологические характеристики hiPSC-CM, мы предлагаем тщательную оценку потенциальных кардиологических рисков, вызванных лекарственными средствами, с помощью компьютерного моделирования. Мы показываем на примере лидокаина и других антиаритмических средств, что использование интегративной экспериментальной и компьютерной платформы позволяет заранее правильно отображать клинические проявления побочных эффектов.

Abstract

The pharmaceutical industry is advancing by utilizing hiPSC-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) for *in vitro* cardiac safety screening. The traditional reliance on QT interval prolongation as the primary marker for cardiotoxicity is being questioned. The Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative suggests incorporating computer modeling and *in silico* platforms for a more comprehensive approach to cardiotoxicity testing, alongside hiPSC-CM *in vitro* screening. Our study introduces an innovative platform that combines *in vitro* hiPSC-CM propagation testing with *in silico* models to evaluate cardiotoxicity. By analyzing the electrophysiological and morphological characteristics of hiPSC-CM, we provide a thorough assessment of potential drug-induced cardiac risks through computer modeling. Using lidocaine and other antiarrhythmics as examples, we demonstrate that by utilizing an integrated experimental and computer platform, it is possible to accurately predict the clinical manifestations of side effects in advance.

Кардиотоксичность остается серьезной проблемой при разработке лекарств, где удлинение интервала QT является одним из основных маркеров. Корреляция между полиморфными желудочковыми тахикардиями и удлинением потенциала действия побудила Европейский комитет рекомендовать рутинное тестирование на удлинение интервала QT обязательным для всех фармакологических продуктов [1, 2]. Однако недавние результаты показали, что удлинение потенциала действия не является надежным маркером потенциальных аритмий и внезапной желудочковой смерти [3, 4].

© В. А. Цвелая, А. К. Бережной, А. П. Синицына, И. С. Семидетнов, В. Д. Наумов, М. М. Слотвицкий, 2024

Пострегистрационный надзор тоже продолжает выявлять кардиотоксичность в одобренных препаратах. Было показано, что первичная кардиотоксичность составляла 74 % случаев отмены препаратов после регистрации [5]. В ответ на это были запущены инициативы Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) и Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) для улучшения клинического прогнозирования риска проаритмии [6, 7]. Эти инициативы продемонстрировали более высокую точность по сравнению с текущими рекомендациями за счет использования тканево-инженерных моделей на основе человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (hiPSC-CM) [8]. Но в этих инициативах сохраняется ряд ограничений, связанных с ограничением данных клеток.

Ранее мы предложили экспериментальную модель iPSC для решения проблемы кардиотоксичности препаратов, вписывающуюся в инициативы [9]. Эта модель использует изотропный монослой кардиомиоцитов, полученных из iPSC, в качестве возбудимой среды. Для инициирования аритмии используется стандартное геометрическое препятствие с большим радиусом кривизны. Не смотря на преимущества представленный тест может быть дорогим и иногда пропускает некоторые механизмы, приводящие к реентри на стандартном препятствии.

Мы предлагаем новую платформу для тестирования кардиотоксичности, которая объединяет небольшое количество экспериментов *in vitro* на hiPSC-CM с предиктивным моделированием *in silico* эффектов лекарств. Наша компьютерная модель показала высокий потенциал для частичной замены дорогостоящих экспериментов по прогнозированию кардиотоксичности и антиаритмогенности соединений на iPSC путем включения показателей из экспериментальных тестов. Мы сравнили нашу окончательную модель с более простыми электрофизиологическими моделями, которые не учитывают межклеточные контакты, и обнаружили, что с некоторыми ограничениями эти более простые модели тоже могут заменить часть экспериментального тестирования. Этот новый набор комбинированных экспериментов *in vitro* и *in silico* был протестирован с потенциально аритмогенными веществами, такими как лидокаин и эндоксан.

Литература

1. Straus S.M., Sturkenboom M.C., Bleumink G.S et al. Non-cardiac QTc-prolonging drugs and the risk of sudden cardiac death // Eur Heart J. 2005. Vol. 26. P. 2007-12

2. Icilio Cavero, Henry Holzgrefe. Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay, a novel *in vitro* / *in silico* paradigm to detect ventricular proarrhythmic liability: a visionary 21st century initiative, Expert Opinion on Drug Safety. 2014. Vol. 13 (6). P. 745–758.

3. Meera Varshneya, Xueyan Mei, Eric A. Sobie. Prediction of arrhythmia susceptibility through mathematical modeling and machine learning. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2021. Vol. 118 (37).

4. Tani Hidenori, Shugo Tohyama. Human engineered heart tissue models for disease modeling and drug discov-ery // Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2022. Vol. 10. P. 855763

5. Yang X., Papoian, T. Moving beyond the Comprehensive *In Vitro* Proarrhythmia Assay: Use of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes to Assess Contractile Effects Associated with Drug-Induced Structural Cardiotoxicity // J. Appl. Toxicol. 2018. Vol. 38. P. 1166–1176.

6. Kanda Y., Yamazaki D., Osada T. et al. Development of Torsadogenic Risk Assessment Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes: Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) Update // J. Pharmacol. Sci. 2018. Vol. 138. P. 233–239.

7. Sakamoto K., Sakatok, K., Sugimot S. et al. Continued Exposure of Anti-cancer Drugs to Human iPS Cell-Derived Cardiomyocytes Can Unmask Their Cardiotoxic Effects // J. Pharmacol. Sci. 2019. Vol. 140. P. 345–349.

8. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer // Toxicological Sciences. 2019. Vol. 168.1. P. 70–77.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-169

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ БЕНЗОАЗОЛЬНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ДНК *

STUDY OF THE PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF THE BENZOAZOLE OLIGONUCLEOTIDE DNA COMPLEX FORMATION

Д. В. Чеботарев, И. И. Юшин, А. А. Ломзов

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

D. V. Chebotarev, I. I. Yushin, A. A. Lomzov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

✉ d.chebotarev@g.nsu.ru

Аннотация

Для формирования комплексов бензоазольных олигонуклеотидов с ДНК определены термодинамические параметры методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Методами остановленной струи и замещения были установлены значения кинетических параметров для процессов ассоциации и диссоциации. На основании полученных результатов был сделан вывод, на уровне какого из процессов модификации оказывают влияние на термическую стабильность комплексов.

Abstract

The thermodynamic parameters of the benzoazole oligonucleotide DNA complex formation were defined by the thermal denaturation method with spectroscopic detection. The kinetic parameters of the association and dissociation processes were obtained by the stopped-flow and substitution methods. The results show which process determining the thermostability of complexes is more influenced on by the addition of the modifications.

Нативные олигонуклеотиды не всегда обладают нужным набором физико-химических свойств для решения различных прикладных задач. В настоящее время модифицированные олигонуклеотиды зарекомендовали себя, в частности, как перспективные молекулярные зонды и праймеры для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Модификации могут быть введены в различные положения олигонуклеотида в процессе синтеза. На сегодняшний день известны олигонуклеотиды, модифицированные по сахарному остову, азотистым основаниям и по фосфатным остаткам. Потенциал использования олигонуклеотидов в практических целях во многом определяется параметрами формирования их дуплексов, которые зависят от pH среды, ионной силы раствора, структуры самих одноцепочечных фрагментов и комплекса, а также ряда других факторов. Одной из основных характеристик олигонуклеотидов является термическая стабильность их комплексов с комплементарными цепями нуклеиновых кислот. Для определения термодинамических параметров формирования комплексов нуклеиновых кислот используют метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Немаловажным для исследования гибридизации олигонуклеотидов является понимание кинетики данного процесса.

В работе показано, что формирование комплексов с фосфорамидными бензоазольными олигонуклеотидами может быть описано в рамках модели двух состояний. Установлено, что введение бензоазольных модификаций приводит к понижению термической стабильности комплексов, и продемонстрирована зависимость этого влияния от нуклеотидного состава модифицированной цепи.

Исследование кинетики формирования комплексов фосфорамидных бензоазольных олигонуклеотидов показало, что введение модификаций изменяет главным образом константу скорости диссоциации, в то время как константа скорости ассоциации остаётся практически неизменной. Были сопоставлены значения констант скорости диссоциации, полученные методами замещения и остановленной струи.

* Исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН РНФ № 23-14-00358.
© Д. В. Чеботарев, И. И. Юшин, А. А. Ломзов, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-170

ФОТОПРОДУКТ ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ УСИЛИВАЕТ ЭФФЕКТ ФОТОИНАКТИВАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ *

ENDOGENOUS PORPHYRIN PHOTOPRODUCTS ENHANCE PHOTOINACTIVATION OF MYCOBACTERIA

Д. М. Шашин, И. Д. Соловьев, А. И. Башева, А. П. Савицкий, М. О. Шлеева

Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

D. M. Shashin, I. D. Soloviev, A. I. Basheva, A. P. Savitsky, M. O. Shleeva

Bach Institute of Biochemistry RAS, Moscow
Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow

✉ dmshashin@gmail.com

Аннотация

Фотодинамическая терапия способствует образованию активных форм кислорода в клетках при воздействии света, уничтожая их. Этот метод можно использовать для борьбы с туберкулезом эффективно поражая покоящиеся и лекарственно-устойчивые бактерии. Облучение микобактерий светом с длиной волны 565 и 650 нм способствует значительной гибели клеток, за счет содержащегося в них копропорфирина.

Abstract

Photodynamic therapy promotes the formation of reactive oxygen species in cells when exposed to light, destroying them. This method can be used to combat tuberculosis by effectively attacking both dormant and drug-resistant bacteria. Irradiation of mycobacteria with light with a wavelength of 565 and 650 nm contributes to significant cell death due to the coproporphyrin contained in them.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — это метод лечения заболеваний различной этиологии, при котором взаимодействие света и фотосенсибилизатора (ФС) внутри клетки-мишени приводит к образованию активных форм кислорода, повреждающих данные клетки и приводящие к их разрушению. ФДТ нашла широкое применяется в онкологии при лечении опухолей различной локализации, но этот метод можно применить и для борьбы с бактериальными инфекциями. Например, для борьбы с патогенными представителями рода *Mycobacterium*, возбудителями микобактериозов и туберкулеза человека. Известно, что *Mycobacterium tuberculosis* способна переходить в покоящееся состояние, в котором она устойчива к действию большинства антибиотиков и долгое время сохраняется в организме человека, обуславливая латентную форму туберкулеза. При этом, переходящие в покоящееся состояние микобактерии накапливают в себе большое количество эндогенных ФС — порфиринов, что делает их уязвимыми к фотодинамическому действию.

Под действием света с длиной волны 565 нм (соответствует пику в спектре поглощения порфиринов) происходила значительная гибель покоящихся форм *Mycolicibacterium smegmatis* и *Mycobacteriun tuberculosis* (99,99 %). При облучении светом с длиной волны 565 нм растворенного копорпорфирина — одного из основных накапливающихся пигментов в микобактериях — наблюдали изменение в спектрах поглощения и флуоресценции раствора, что свидетельствует о накоплении фотопродукта (появляется пик 650 нм в спектре поглощения). Фотопродукт оказывает дополнительное фототоксическое действие на клетку. При последовательном воздействии света с длиной волны 565 нм и затем с длиной волны 650 нм на порфирин-содержащие клетки *Mycolicibacterium smegmatis* усиливается эффект фотодинамической инактивации микобактерий.

Таким образом, облучение порфирин-содержащих микобактерий при проведении антимикробной ФДТ демонстрирует синергичный эффект, способствуя более эффективному уничтожению патогенов Полученные результаты открывают новые возможности для разработки более эффективных методов фотодинамической терапии микобактериальных инфекций.

* Работа поддержана РНФ (проект № 24-15-00221).

© Д. М. Шашин, И. Д. Соловьев, А. И. Башева, А. П. Савицкий, М. О. Шлеева, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-171

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОАРХИТЕКТОНИКИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ДОНОРОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «МЕДОМЕКСИ»

CYTOARCHITECTONICS INVESTIGATION'S OF RED BLOOD CELLS UNDER EXPOSURE TO THE DRUG "MEDOMEXY"

В. П. Шевченко, О. В. Путинцева, Л. О. Соколова, В. Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

V. P. Shevchenko, O. V. Putintseva, L. O. Sokolova, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

✉ lyubov.nagornyak58@gmail.com

Аннотация

Исследовали состояние цитоархитектоники эритроцитов человека до и после контакта с препаратом «Медомекси» методом СЭМ. Анализ полученных результатов свидетельствует о снижении количества дискоцитов и увеличении обратимо- и необратимодеформированных форм при возрастании времени инкубации от 1 до 24 часов. Этот эффект нужно учитывать при регулировании протекания свободнорадикальных процессов, приводящих к развитию инсульта, болезни Альцгеймера, инфаркту миокарда и другим заболеваниям у пациентов.

Abstract

The state of the cytoarchitectonics of human erythrocytes was studied before and after contact with the drug "Medomexy" by the SEM method. The analysis of the obtained results indicates a decrease in the number of discocytes and an increase in reversible and irreversible deformed forms with an increase in incubation time from 1 to 24 hours. This effect should be taken into account when regulating the course of free radical processes leading to the development of stroke, Alzheimer's disease, myocardial infarction and other diseases in patients.

Для купирования эффектов свободнорадикальных процессов в клинической практике широко используются препараты группы антиоксидантов. К данной группе относится и «Медомекси». В его состав входит этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭМГПС) как основное действующее вещество, а также метабисульфит натрия — в качестве вспомогательного [2]. Благодаря наличию химически активных групп, «Медомекси», вероятно, способен взаимодействовать и с компонентами мембран клеток. Поэтому определенный интерес вызывает изучение влияния ЭМГПС на цитоархитектонику эритроцитов. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является мощным инструментом, используемым для визуализации и анализа поверхностей биообъектов, и широко применяется в медицине и биологии [3].

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось исследование кратковременного и длительного влияния «Медомекси» на состояние цитоархитектоники эритроцитов доноров.

Эритроциты получали по стандартной методике [4]. К 9 мл суспензии эритроцитов (10^6 кл/мл) добавляли 1 мл «Медомекси» ($5{,}4 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Образцы инкубировали при +37 °С в течение 1 и 24 ч. Поверхностную архитектонику эритроцитов крови доноров исследовали с помощью СЭМ. При подготовке контрольные и опытные образцы эритроцитов фиксировали 2,5%-м раствором глутарового альдегида (Sigma, США) в течение 1 ч, а затем промывали в 0,01 моль/л Na-фосфатным буфером (pH 7,4) не менее трех раз. Обезвоживание образцов проводили путем центрифугирования в серии водных растворов этанола восходящей концентрации — 50, 70 и 90 %. Приготовленные суспензии эритроцитов наносили на керамические подложки и высушивали в термостате при 37 °С [5]. Препараты напыляли золотом и просматривали на сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM — 6510 LV (Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ в лаборатории ЦКПНО ВГУ. Анализ структурного состояния мембран эритроцитарных клеток осуществляли по классификации Г. И. Козинца и Ю. Симворт [6].

Согласно полученным данным, нативная суспензия эритроцитов содержала 92,5 ± 3,6 % дискоцитов (Д), 4,8 ± 0,8 % обратимо деформированных (ОД) и 2,7 ± 0,4 % необратимо деформированных клеток (НД). Индексы трансформации интактных эритроцитов имели следующие показатели: ИТ — 0,08 ± 0,03; ИОТ — 0,05 ± 0,002; ИНОТ — 0,03 ± 0,001. Полученные данные соответствуют морфологической картине красных клеток крови здорового человека [6].

© В. П. Шевченко, О. В. Путинцева, Л. О. Соколова, В. Г. Артюхов, 2024

Анализ результатов показывает, что параметры цитоархитектоники интактных эритроцитов после 1 ч инкубации при 37 °С не имели статистических отличий от исходного образца. После 24-часовой инкубации количество дискоцитов сократилось до 77,3 %, а число ОД и НД форм увеличилось до 13,7 и 9 % соответственно.

После модификации суспензии эритроцитов человека лекарственным препаратом «Медомекси» в течение 1 ч наблюдалось уменьшение показателя Д до 72,9 ± 1,7 %, увеличение числа ОД форм до 23,6 ± 1,4 % и снижение уровня НД клеток до 3,5 ± 0,67 % относительно контроля.

24-часовое взаимодействие с лекарственным препаратом «Медомекси» способствовало значительному уменьшению параметра Д до 38,8 ± 1,6 % и увеличению количества ОД (45,7 ± 2,5 %) и НД форм (15,5 ± 2,4 %).

Таким образом, анализ результатов проведенных модельных экспериментов по изучению цитоархитектоники эритроцитов крови доноров до и после контакта с лекарственным препаратом «Медомекси» свидетельствует о его способности активно влиять на состояние мембран эритроцитарных клеток и их морфофункциональную организацию.

Литература

1. Пожилова Е. В., Новиков В. Е., Новикова А. В. Фармакодинамика и клиническое применение препаратов на основе гидроксипиридина // Вестник СГМА. 2013. Т. 12, № 3. С. 56–66.

2. Справочник Видаль: Лекарственные препараты в России. М.: АстраФармСервис, 2011. 1728 с.

3. Соколова Л. О., Калаева Е. А., Артюхов В. Г. и др. Влияние полиенового антибиотика амфотерицина В на цитоархитектонику и осмотическую резистентность эритроцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2023. Т. 175, № 4. С. 467–472.

4. Артюхов В. Г. и др. Практикум по биофизике. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. 294 с.

5. Bhowmick S., Das D. K., Mati A. K. Structural and textural classification of erythrocytes in anaemic cases: A scanning electron microscopic study // Micron. 2013. Vol. 44. P. 384–394.

6. Козинец Г. И., Симоварт Ю. Поверхностная архитектоника клеток периферической крови. Таллин: Валгус, 1984, 116 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-172

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ МОДЕЛЬ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В ЯДРЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ *

MODEL OF CHROMATIN ORGANIZATION IN BIOLOGICAL CELL NUCLEI BASED ON SANS AND SAXS DATA

Е. Г. Яшина[1,2], Е. Ю. Варфоломеева[1], Р. А. Пантина[1], В. Ю. Байрамуков[1], Р. А. Ковалев[1], Н. Д. Федорова[1], К. А. Пшеничный[1], Ю. Е. Горшкова[3], С. В. Григорьев[1,2]

[1] *Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина*
[2] *Санкт-Петербургский государственный университет*
[3] *Объединенный институт ядерных исследований, Дубна*

E. G. Iashina[1,2], E. Yu. Varfolomeeva[1], R. A. Pantina[1], V. Yu. Bayramukov[1], R. A. Kovalev[1], N. D. Fedorova[1], K. A. Pshenichny[1], Yu. E. Gorshkova[3], S. V. Grigoriev[1,2]

[1] *Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina*
[2] *Saint Petersburg State University*
[3] *Joint Institute for Nuclear Research, Dubna*

✉ yashina_91@inbox.ru

Аннотация

Обобщая результаты МУР на ядрах биологических клеток и успех описания транскрипционно неактивного (закрытого) хроматина моделью фрактальной глобулы, мы предлагаем бифрактальную модель структуры ядра, согласно которой внутри плотнозапакованного закрытого хроматина находится система транспортных каналов (логарифмический фрактал), а активный хроматин локализуется вблизи или внутри транспортных каналов и образует объемнофрактальные структуры.

Abstract

Summarizing the results of SAS on biological cell nuclei and the success of describing transcriptionally inactive (closed) chromatin by the fractal globule model, we propose a bifractal model of the structure of the nucleus, according to which a system of transport channels (logarithmic fractal) is located inside the densely packed closed chromatin, and active chromatin is localized near or inside the transport channels and forms volumetric fractal structures.

За последнее десятилетие установлен факт фрактальной организации хроматина для разных типов клеток с помощью методов малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН, УМУРН, СЭМУРН) и рентгеновского излучения (МУРР). Интенсивность МУРН, полученная при рассеянии на ядрах нормальных клеток, таких как ядра крысиных лимфоцитов, описывается кубическим законом рассеяния в зависимости от модуля вектора переданного импульса ($I = A \cdot Q^{-3}$) в диапазоне [10^{-4}–$3 \cdot 10^{-2}$] A^{-1} (рис. 1), что в рамках классификации МУР на фрактальных объектах соответствует модели логарифмического фрактала [1].

Интенсивность МУРН, полученная при рассеянии на ядрах опухолевых клеток, таких как ядра HeLa, описывается двустепенным законом с кубическим законом рассеяния ($I = Q^{-3}$) в диапазоне [$4 \cdot 10^{-4}$–$4 \cdot 10^{-3}$] A^{-1} и степенным законом ($I = Q^{-n}$) с показателем $n = 2.55(5)$ (рис. 2, *а*), что соответствует бифрактальной модели: крупномасштабный фрактальный уровень описывается моделью логарифмического фрактала, а мелкомасштабный — моделью объемного фрактала с размерностью $D_F = 2.5$.

В классификации МУР на фрактальных объектах модель объемного фрактала соответствует однородной самоподобной классической фрактальной структуре, характеризующейся хаусдорфовой размерностью D_F, и наблюдается в эксперименте как убывающая степенная зависимость интенсивности малоуглового рассеяния от вектора рассеяния с показателем $2 < n < 3$ ($\nu = D_F$), в то время как модель логарифмического фрактала представляет

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 20-12-00188).

© Е. Г. Яшина, Е. Ю. Варфоломеева, Р. А. Пантина, В. Ю. Байрамуков, Р. А. Ковалев, Н. Д. Федорова, К. А. Пшеничный, Ю. Е. Горшкова, С. В. Григорьев, 2024

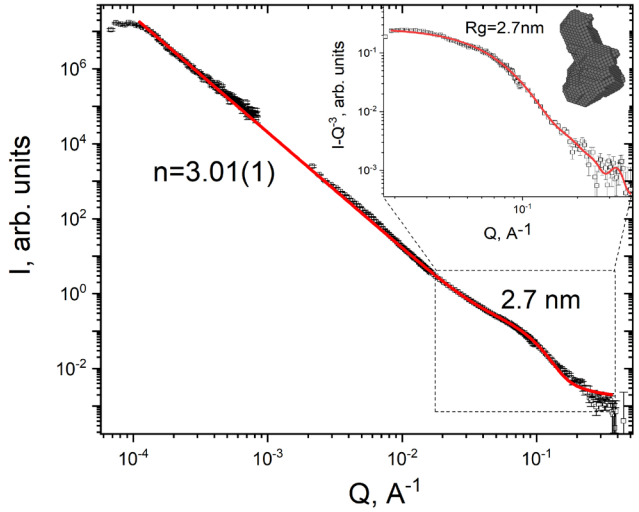


Рис. 1. Интенсивность МУРН на ядрах крысиных лимфоцитов, помещенных в D_2O (KWS-2 и KWS-3 MLZ, Германия, Гархинг)

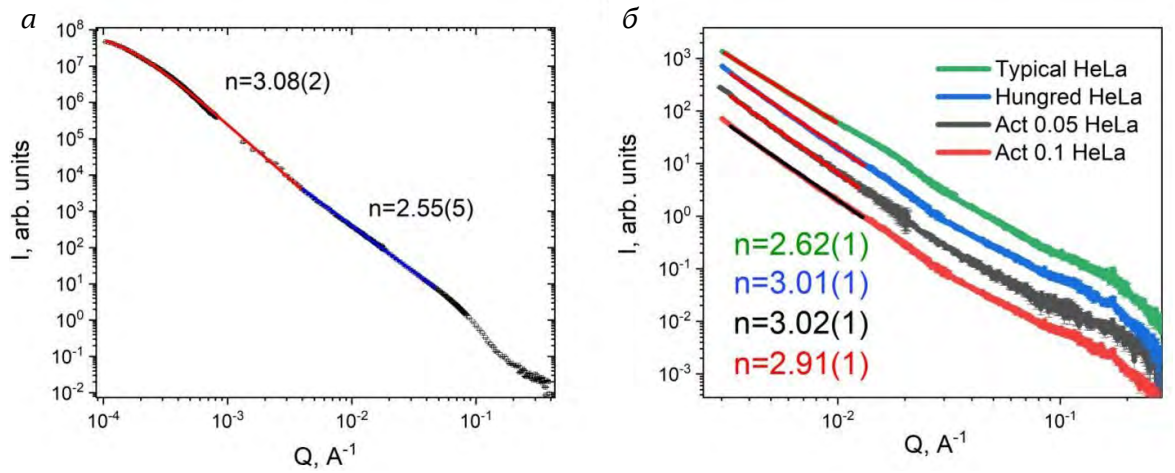


Рис. 2: а — интенсивность МУРН на ядрах HeLa, помещенных в D_2O (KWS-2 и KWS-3 MLZ, Германия, Гархинг);. *б* — интенсивность МУРР для референсных ядер HeLa (*зеленая кривая*), для ядер HeLa, культивированных в условиях дефицита питательной среды (*синяя кривая*), для ядер HeLa, культивированных с добавлением ингибитора транскрипции Актиномицином Д с концентрацией 0,05 и 0,1 (*черная и красная кривые соответственно*) (XEUSS 3.0 ОИЯИ, Россия, Дубна)

иерархическую структуру, которая описывается логарифмической мерой и формируется согласно принципу сохранения объема при изменении масштаба. Экспериментально структура логарифмического фрактала наблюдается как кубический закон в интенсивности малоуглового рассеяния.

Эксперименты по исследованию влияния транскрипционной активности хроматина на его структуру демонстрируют исчезновение объемнофрактальной структуры в ядрах HeLa с подавленной транскрипционной активностью с помощью культивирования в условиях дифицита питательноси среды и культивирования с добавлением ингибитора транскрипции актиномицина Д (рис. 2, *б*) в диапазоне переданных импульсов $[3 \cdot 10^{-2}–1.5 \cdot 10^{-1}]$ A^{-1}.

Анализ интенсивности МУРР в диапазоне $[10^{-2}–3 \cdot 10^{-1}]$ A^{-1} показал наличие 30–40-нанометровых петель нуклеосомной нити в ядрах HeLa с подавленной транскрипцией, а в референсных ядрах HeLa более плотной глобулярной структуры, образованной белками и нуклеосомной нитью.

Таким образом, наблюдаемая в экспериментах по МУРН и МУРР структура логарифмического фрактала обеспечивает равномерное по всему пространству ядра рассредоточение полостей на разных масштабах, потенциально необходимых для обеспечения быстрого и эффективного транспорта и возможности осуществления

биологической функции в любом месте ядра. Транскрипционная активность хроматина скоррелирована и возможно определяет появление, размер и размерность объемного фрактала. Возниконовение объемнофрактальных структур обусловлено механическими свойствами ДНК, которая выпетливается в полость транспортных каналов (логарифмический фрактал) для осуществления транскрипции [2].

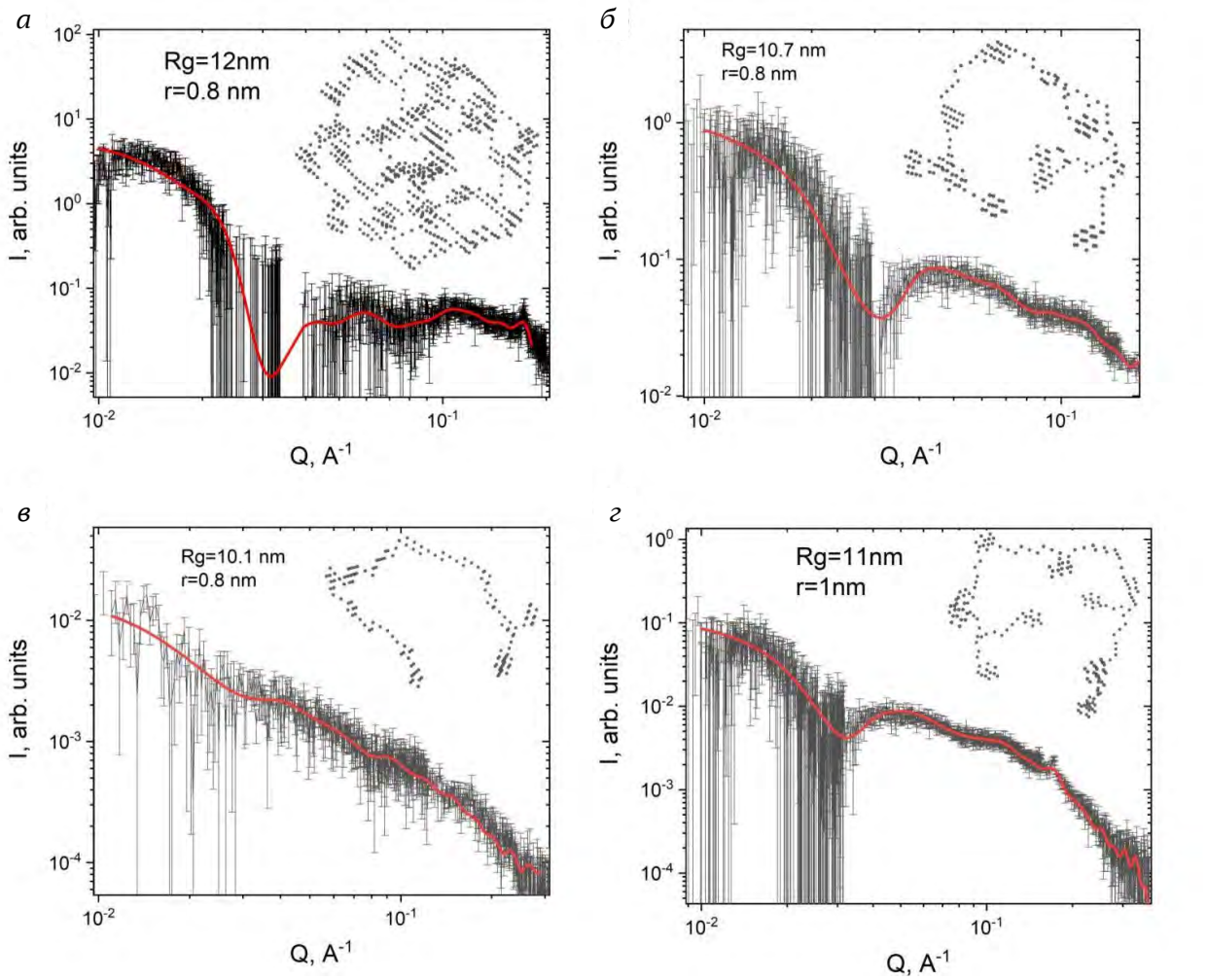


Рис. 3. Интенсивность МУРР с вычетом соответствующей степенной зависимости, указанной на рис. 2, *б*: *а* — для референсных ядер HeLa; *б* — для ядер HeLa, культивированных в условиях дефицита питательной среды; *в* и *г* — для ядер HeLa, культивированных с добавления ингибитора транскрипции Актиномицином Д с концентрацией 0,05 и 0,1 соответственно

Литература

1. Iashina E. G., Grigoriev S. V. Small-angle neutron scattering at fractal objects // Journal of Surface Investigation: X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques. 2017. Vol. 11. P. 897–907.

2. Яшина Е. Г., Варфоломеева Е. Ю., Пантина Р. А. и др. Пространственная модель организации хроматина в ядре биологической клетки по данным малоуглового рассеяния // Письма в ЖЭТФ. 2023. Т. 118(10). С. 776–781.

РАЗДЕЛ IV

ВИРУСОЛОГИЯ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-173

DEVELOPMENT OF PRIMER PANEL FOR AMPLICON SEQUENCING OF HUMAN PARAINFLUENZA VIRUS TYPE 3

O. Mansour[1,2], D. M. Danilenko[2], A. B. Komissarov[2]

[1] *Saint Petersburg State University*
[2] *Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg*

✉ olamansor1995@gmail.com

Abstract

Human parainfluenza viruses (hPIVs) are prominent etiological causes of acute respiratory tract infections. Genomic surveillance of hPIVs is not carried out in Russia. To date, there are no whole sequence data available that would allow for detailed epidemiological and phylogenetic analysis of circulating strains. This research aimed to develop primer panels for sequencing the whole viral genome of hPIV3 and describe the genetic diversity of these viruses.

Respiratory tract illnesses are significant global health concerns, impacting millions of people annually. Human parainfluenza viruses (hPIVs) are key contributors to these respiratory illnesses. Seasonal hPIV epidemics impose a significant disease burden, especially in children, accounting for 40 % of pediatric hospitalizations for lower respiratory tract illnesses (LRTIs) second only to respiratory syncytial virus (RSV) and 75 % of croup cases. In immunocompromised or elderly adults, hPIV infections can progress to severe and life-threatening pneumonia [1]. Based on genetic, antigenic and morphological criteria, human parainfluenza viruses have been divided into four distinct serotypes 1–4, with hPIV1 and hPIV3 belonging to the Respirovirus genus and hPIV2 and hPIV4 belonging to the Rubulavirus genus [2]. The viral genome encodes six structural proteins, with the hemagglutinin-neuraminidase (HN) surface glycoprotein being of particular interest. The HN protein plays a critical role in pathogenesis, including host cell recognition, fusion, and viral release [3, 4].

In Russia, genomic surveillance of human parainfluenza viruses is not conducted. As a result, comprehensive molecular and genetic characterization data are lacking. Viral sequence information is needed to understand their genetic diversity, evolution, and potential recombination events, which is vital for thorough monitoring, prevention, and control of these pathogens. The present study attempted to design primer panels facilitating the amplification of the whole genome of human parainfluenza virus type 3, and perform a phylogenetic analysis based on HN gene sequences circulating of Russian strains.

A Set of 23 primer pairs was designed using the PrimalScheme tool (https://primalscheme.com) to cover the entire viral genome. The primer design was based on the consensus sequence obtained from a multiple alignment of 735 complete hPIV3 genomes available at NCBI. Each primer pair covers approximately 1 kb of the genome with an amplicon overlap of approximately 200 bp (Fig. 1). Two primer pools were prepared where each of them contained 12 and 11 primer pairs, with even and odd numbers.

Positive samples with high viral load (Ct < 22) were selected for whole genome amplification. Using the developed primer panel, 47 hPIV3 samples were amplified. For each parainfluenza 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 instructions. RT-PCR products were used for further sample preparation of libraries for sequencing. Whole genome sequencing of amplicons was performed using Illumina Nextseq platform. Multiple alignment of nucleotide sequences was performed using MAFFT software. Phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood (ML) method using the RAxML and TreeSub. FigTree v1.4.4 tool was used to visualize phylogenetic trees.

© O. Mansour, D. M. Danilenko, A. B. Komissarov, 2024

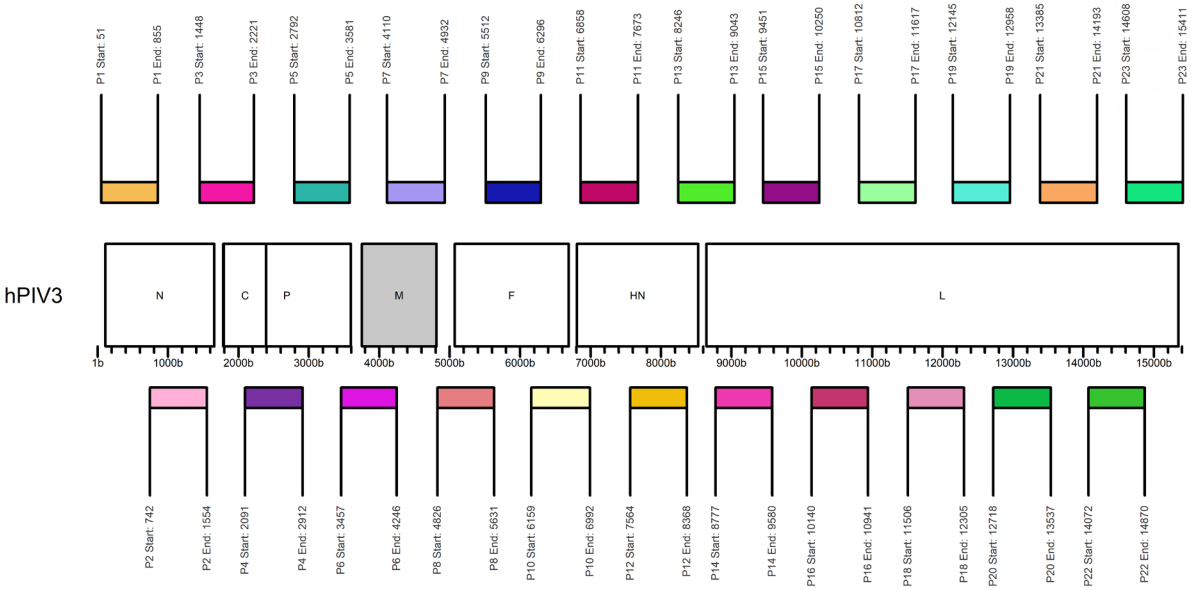


Fig. 1. Scheme of primer arrangement on the genome of parainfluenza virus type 3

With a data volume of 300 thousands reads per sample, the developed panel demonstrated median coverage, allowing for the establishment of a consensus genome sequence (Fig. 2). The proportion of the genome with coverage of more than 20x was around 95 % for most sequences. As a result of this study, 15 full-genome sequences of human parainfluenza virus type 3 from Russia were obtained for the first time. The developed primer panels can be used in the framework of genomic surveillance of ARVI pathogens.

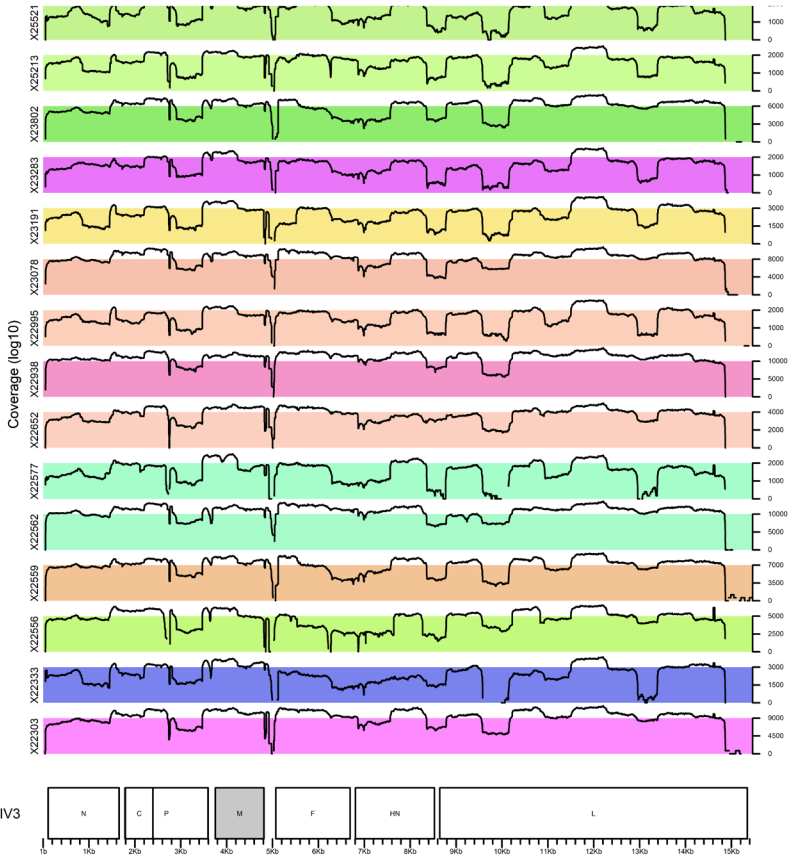


Fig. 2. Coverage plot of hPIV3 sequences. The coverage plot was made using VizCov R script (https://github.com/LMV-NIC-St-Petersburg/VizCoV)

The genetic analysis conducted during the study showed heterogeneity in the composition of circulating populations of human parainfluenza virus type 3. Phylogenetic analysis of the HN gene showed the presence of various phylogenetic groups among the viruses studied. It was established that HN sequences belong to cluster C, but within it are distributed among different subclusters.

References

1. Hall C. B. Respiratory Syncitial Virus and Parainflueza Virus // N. Engl. J. Med. 2001. Vol. 344 (25). P. 1917–1928.

2. Collins P., Karron R. Parainfluenza Viruses // Fields Virology. 6th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. P. 1044–1079.

3. Porotto M., Murrell M., Greengard O. et al. Influence of the Human Parainfluenza Virus 3 Attachment Protein's Neuraminidase Activity on Its Capacity To Activate the Fusion Protein // J. Virol. 2005. Vol. 79 (4). P. 2383–2392.

4. Palermo L. M., Porotto M., Yokoyama C. C. et al. Human Parainfluenza Virus Infection of the Airway Epithelium: Viral Hemagglutinin-Neuraminidase Regulates Fusion Protein Activation and Modulates Infectivity // J. Virol. 2009. Vol. 83 (13). P. 6900–6908.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-174

PORCINE VIRUSES IN THE WILD BOAR POPULATION OF THE CENTRAL FEDERAL DISTRICT OF RUSSIA*

V. S. Rykova, N. Y. Krasnikov, A. G. Yuzhakov

Federal Scientific Center VIEV, Moscow

✉ valentinarycova@inbox.ru

Abstract

Porcine viral diseases cause significant harm to the pig industry. Wild boars can be a natural reservoir of domestic pig's pathogens. Thus, monitoring studies directed on their infectious status help veterinary specialists to determine the current epizootic situation in the country. The study of the prevalence of porcine viruses in the wild boar population in the Central Federal District of Russia is necessary due to the presence of intensive pig farming.

Between 2021 and 2023, samples were collected from 79 hunter-harvested wild boars in three regions of Russia: 30 from Moscow, 24 from Tver', and 25 from Belgorod Regions. From each hunted animal, three different sample types were taken: bronchial lymph node, lung, and spleen. Collected samples were transported to the laboratory under freezing conditions. From each organ sample, a piece of tissue was taken and homogenized in saline solution, the prepared samples were aliquoted in 1.5mL Eppendorf tubes and stored at −70°C. The total DNA was extracted from the supernatant of organ suspension using the commercial kit "RIBO-prep" (FBIS Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia) following the manufacturer's instructions.

The samples were tested for the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSFV), porcine circoviruses 2-4 (PCV-2-4), and porcine parvoviruses 1-7 (PPV-1-7). To detect genomes of PRRSV, CSFV, PCV-2, and PPV-1, real-time PCR (qPCR) was conducted using a commercial PCR test kit (Vetbiochem, Moscow, Russia) according to the manufacturer's instructions. For PCV-3, PCV-4, PPV-2-7 detection, primers and probes were used from the previous studies [1–6]. Samples with the best Ct-value in qPCR or the best quality during electrophoresis were subjected to Sanger genome sequencing and genotyping for further phylogenetic analysis. DNA sequence chromatograms were analyzed and assembled into final consensus using SeqMan Lasergene 11.1.0. (DNASTAR, Madison, WI, United States). The phylogenetic analysis was performed using MEGA 7.0 software.

Results of this study are presented in Table 1 (see table). Porcine pathogens PCV-2 and PPV-1 were detected in 63.3 and 25.3 % of animals, respectively. PCV-3, which pathogenicity has not been proven yet, was found in 41.8 % of wild boars. PPV-2-7 were also detected in 30.4, 53.2, 1.3, 2.5, 7.6, 59.5 %, respectively. Genomes of the PRRSV, CSFV and PCV-4 were not found in any of the studied samples.

Distribution of porcine viruses in wild boars in the regions of the Russian Federation

	Infected wild boars, animals			Total number of infected wild boars	
	Moscow Region	Tver' Region	Belgorod Region	Animals	%
PCV-2	19	12	19	50	63,3
PCV-3	7	13	13	33	41,8
PPV-1	6	6	8	20	25,3
PPV-2	5	11	8	24	30,4
PPV-3	11	15	16	42	53,2
PPV-4	0	0	1	1	1,3
PPV-5	1	1	0	2	2,5
PPV-6	2	0	4	6	7,6
PPV-7	21	11	15	47	59,5

The phylogenetic analysis was performed for PCV-2, PCV-3, and PPV-1. We sequenced 23 genomes of PCV-2: 15 from Moscow, seven from Tver', and one from Belgorod Regions, respectively. Phylogenetic analysis for PCV-2 was performed by ORF2 (*Cap* gene). Finally, 21/23 isolates belonged to PCV-2d genotype, two isolates from Moscow region belonged to PCV-2b. For PCV-3, four complete genomes from Moscow and two from Tver' regions were sequenced. All

* Supported by RSF (№ 23-76-10055).

© V. S. Rykova, N. Y. Krasnikov , A. G. Yuzhakov, 2024

sequenced isolates belonged to PCV-3a genotype. For PPV-1 phylogenetic analysis, ORF2 (VP1/VP2) were used. We sequenced five isolates from Moscow, one from Tver', and four from Belgorod Regions. According to the result of phylogenetic analysis, PPV-1 genotypes of both Asian and European lineages were identified among wild boars.

References

1. Palinski R., Pineyro 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 // J. Virol. 2017. Vol. 91. e01879–16.

2. Zhang H. H., Hu W. Q., Li J. Y. et al. Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as porcine circovirus 4, Hunan province, China // Transbound. Emerg. Dis. 2019. Vol. 67. P. 1057–1061.

3. Ni J., Qiao C., Han X. et al. Identification and genomic characterization of a novel porcine parvovirus (PPV6) in China // Virol J. 2014. et al. Vol. 11. P. 203.

4. Xiao C. T., Giménez-Lirola L. G., Jiang Y. H. et al. Characterization of a novel porcine parvovirus tentatively designated PPV5 // PLoS One. 2013 Jun 7. Vol. 8 (6). e65312.

5. Xiao C. T., Giménez-Lirola L. G., Halbur P. G., Opriessnig T. Increasing porcine PARV4 prevalence with pig age in the U.S. pig population // Vet. Microbiol. 2012 Dec 7. Vol. 160 (3–4). P. 290–296.

6. Xiao C. T., Gerber P. F., Giménez-Lirola L. G. et al. Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA // Vet. Microbiol. 2013 Jan 25. Vol. 161 (3–4). P. 325–330.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-175

ВИРУС-ИНДУЦИРУЕМЫЙ ФАКТОР KPILP *NICOTIANA TABACUM* СТИМУЛИРУЕТ МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ МАКРОМОЛЕКУЛ *

NICOTIANA TABACUM VIRUS-INDUCED FACTOR KPILP STIMULATES INTERCELLULAR TRANSPORT OF MACROMOLECULES

А. Р. Алимова[1,2], 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*

A. R. Alimova[1,2], 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*

✉ alfiya_2000@mail.ru

Аннотация

В растениях клетки сообщаются друг с другом посредством плазмодесм, пропускная способность которых ограничена и строго регулируется с помощью различных механизмов. Вирусы растений способны вызывать «расширение» просвета плазмодесм для распространения по растению, зачастую эксплуатируя клеточные факторы для этого. В работе исследован вирус-индуцируемый клеточный фактор табака, повышающий проницаемость плазмодесм.

Abstract

In plants, cells are connected with each other via plasmodesmata, permeability of which is limited and highly regulated with various mechanisms. Viruses are able to perform plasmodesmata gating to move from cell to cell and within the plant. They exploit cellular factors to affect plasmodesmata. Current study provides characteristics of such virus-induced tobacco cellular factor that activates intercellular transport.

Межклеточный транспорт макромолекул и низкомолекулярных соединений у высших растений осуществляется через плазмодесмы (ПД) — каналы, соединяющие цитоплазму соседних клеток. Кроме того, ПД используются различными вирусами растений для межклеточного (ближнего) транспорта. В регуляции пропускной способности ПД участвуют клеточные белки, локализованные как в ПД, так и в других компартментах клетки, а также полисахарид каллоза [1]. Одним из факторов, влияющих на проницаемость ПД, является KPILP (*Kunitz peptidase inhibitor-like protein*), обнаруженный в модельном растении *Nicotiana benthamiana*. Ранее показано, что 1) в норме *NbKPILP* экспрессируется преимущественно в корнях интактных растений; 2) уровень мРНК *NbKPILP* возрастает тысячекратно при заражении вирусом табачной мозаики (ВТМ); 3) *NbKPILP* стимулирует межклеточный транспорт макромолекул в листьях; 4) *NbKPILP* способствует развитию инфекции ВТМ [2–4]. Гомологи KPILP были обнаружены у ряда представителей семейства Пасленовых, но без дополнительной верификации нельзя экстраполировать свойства исследуемого клеточного фактора модельного растения на его гомологи из других, даже близкородственных видов. Целью настоящей работы было определить особенности экспрессии *KPILP N. tabacum* L. (cv. Petit Havana) (*NtKPILP*) и его роль в регуляции межклеточного транспорта в табаке. В ходе работы выявлено, что наиболее высокий уровень экспрессии *NtKPILP* детектируется в корнях как зрелых растений (возраст 5–6 недель), так и проростков, при этом в листьях относительное количество мРНК в 10–15 раз ниже, чем в корнях. Для оценки экспрессии *NtKPILP* в ответ на вирусную инфекцию растения *N. tabacum* L. (cv. Petit Havana) заражали ВТМ. Уровень экспрессии *NtKPILP* в листьях на 7–10-й день после заражения повышался в 250 раз по сравнению с интактными растениями. Таким образом, в ответ на инфекцию ВТМ происходит активация *NtKPILP* в *N. tabacum*, т. е. *KPILP* является вирус-индуцируемым клеточным фактором как в *N. benthamiana*, так и в *N. tabacum*.

Роль NtKPILP в регуляции межклеточного транспорта оценивали в трех группах табаков: интактные растения, растения с повышенной экспрессией *NtKPILP* и растения, в которых его экспрессия была подавлена с помощью вирус-индуцируемого сайленсинга. Такая модельная система аналогична разработанной ранее

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 19-74-20031).

© А. Р. Алимова, Н. М. Ершова, К. А. Камарова, Е. В. Шешукова, Т. В. Комарова, 2024

для *N. benthamiana* [3, 4]. Растения каждой из групп инфильтрировали суспензией агробактерий для доставки в клетки листьев плазмиды для синтеза 2xGFP (две слитые молекулы GFP). Этот репортерный белок используется в качестве маркера для оценки эффективности межклеточного транспорта, так как он может распространяться из первично-трансформированной клетки в соседние только при увеличенной апертуре ПД. В интактных табаках через 48 ч после агроинфильтрации 100 % клеток с флуоресцентным сигналом GFP являлись одиночными (2xGFP не перемещался из клетки в клетку). В табаках с повышенной или подавленной экспрессией *NtKPILP* наблюдалось формирование многоклеточных кластеров, содержащих сигнал GFP. После подсчета одиночных клеток и кластеров с флуоресцентным сигналом оказалось, что при повышенной экспрессии *NtKPILP* доля многоклеточных (состоящих из 3х и более клеток) кластеров составила 27,4 % (± 2,2), а доля одиночных клеток — 52,2 % (± 2,5). В листьях с подавленной экспрессией *NtKPILP* доля многоклеточных кластеров составила 1,5 % (± 1), а доля одиночных клеток — 81,5 % (± 4). Анализ уровня отложений каллозы в районе ПД в листьях растений каждой из групп показал, что повышение экспрессии *NtKPILP* приводит к двукратному снижению содержания каллозы, что согласуется с результатами функционального теста с 2xGFP. Таким образом, можно заключить, что повышение уровня экспрессии *NtKPILP* приводит к увеличению пропускной способности ПД по каллоза-зависимому механизму и активации межклеточного транспорта в растениях *Nicotiana tabacum* L. (cv. Petit Havana).

Литература

1. Dorokhov Y. L. et al. Plasmodesmata Conductivity Regulation: A Mechanistic Model // Plants. 2019. Vol. 8. Plasmodesmata Conductivity Regulation, № 12. P. 595

2. Sheshukova E. V. et al. An Alternative Nested Reading Frame May Participate in the Stress-Dependent Expression of a Plant Gene // Front. Plant Sci. 2017. Vol. 8. P. 2137.

3. Ershova N. et al. Nicotiana benthamiana Kunitz peptidase inhibitor-like protein involved in chloroplast-to-nucleus regulatory pathway in plant-virus interaction // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13. P. 1041867.

4. Ershova N. et al. A novel cellular factor of Nicotiana benthamiana susceptibility to tobamovirus infection // Front. Plant Sci. 2023. Vol. 14. P. 1224958.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-176

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ СЕРОТИПОВ АДЕНОВИРУСОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ОРЗ В ТАШКЕНТЕ, РЕСПУБЛИКА УЗБЕКИСТАН

OCCURRENCE OF ADENOVIRUS SEROTYPES AMONG PEOPLE WITH ARI IN TASHKENT, REPUBLIC OF UZBEKISTAN

С. Б. Бердиева[1], Д. С. Демина[1], И. Д. Осипов[1], Д. Е. Маслов[1], В. А. Васиховская[1], Д. С. Забелина[1], С. И. Рузметова[2], Д. А. Камолходжаев[2], Н. С. Ибадуллаева[2], А. С. Хикматуллаева[2], Э. И. Мусабаев[2], Д. Ш. Кушакова[3], Э. Ф. Аглетдинов[4], С. В. Нетёсов[1]

[1]*Новосибирский государственный университет*
[2]*Научно-исследовательский институт вирусологии, Ташкент*
[3]*Национальный университет Узбекистана, Ташкент*
[4]*АО «Вектор-Бест» Новосибирск*

S. B. Berdieva[1], D. S. Demina[1], I. D. Osipov[1], D. E. Maslov[1], V. A. Vasikhovskaya[1], D. S. Zabelina[1], S. I. Ruzmetova[2], D. A. Kamolkhodzhaev[2], N. S. Ibadullaeva[2], A. S. Khikmatullaeva[2], E. I. Musabaev[2], D. Sh. Kushakova[3], E. F. Agletdinov[4], S. V. Netesov[1]

[1]*Novosibirsk State University*
[2]*Research Institute of Virology, Tashkent*
[3]*National University of Uzbekistan, Tashkent*
[4]*Vector-Best, JSC, Novosibirsk*

✉ s.berdieva@g.nsu.ru

Аннотация

Мониторинг ОРВИ проводится лишь для ряда вирусов (грипп, парагрипп, коронавирусы), при этом в популяции циркулируют другие опасные возбудители ОРВИ/ОРЗ. Так, в 10 % случаев ОРВИ вызвано аденовирусами. Из 686 проб от госпитализированных с ОРЗ пациентов в Ташкенте в 71 обнаружена ДНК аденовирусов. Были выявлены 3 пробы 7-го серотипа (вид B), 6 — 55-го серотипа и 1 — 6-го серотипа (вид C). В дальнейшем мы планируем продолжать мониторинг встречаемости аденовирусов различных серотипов.

Abstract

Careful monitoring of acute respiratory infections is carried out only for a limited number of viruses (influenza, parainfluenza, coronaviruses), while other ARVI/ARI pathogens circulate in the population including adenoviruses. In the etiology of acute respiratory viral infections, adenoviruses account for up to 10 % of all cases. Among 686 samples taken from patients hospitalized with acute respiratory infections in Tashkent, 71 were positive for adenoviruses. Of these samples, fragments of the hexon protein gene were sequenced in 10. As a result, three samples of serotype 7 were identified, which belongs to type B and in some cases can cause death, sample 6 of serotype 55, and 1 sample with serotype 6 was also detected. In the future, we plan to continue monitoring the incidence of respiratory adenoviral infections and expand the selection of genotyped samples.

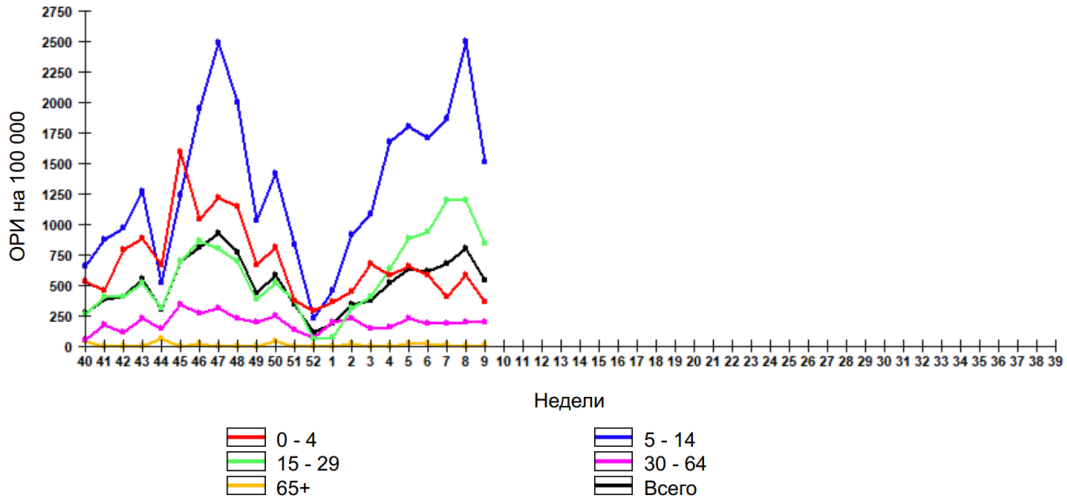
Стандартное определение случая острой респираторной инфекции (ОРИ, ECDC/ВОЗ): острое начало (не раньше 10 дней назад) с наличием как минимум одного из респираторных симптомов (кашля, боли в горле, одышки, насморка/ринита), а также клиническое заключение о том, что заболевание обусловлено инфекцией. При ОРВИ во всех возрастных группах отмечалось снижение показателей заболеваемости (см. рисунок).

Комплект документов (протокол исследования, анкета для пациентов, информированное согласие, идентификационный листок) прошел рассмотрение Этическим комитетом. Этический комитет выдал письменное разрешение на проведение работ с мазками, взятыми от пациентов.

Аденовирусы имеют особое значение в качестве векторов для вакцин и генотерапевтических препаратов. Представленность тех или иных серотипов аденовирусов в этом отношении определяет эффективность получаемого препарата, так как напрямую скоррелирована с наличием иммунитета к этому серотипу. Предсуществующий иммунитет снижает эффективность аденовирусных препаратов, поскольку способствует выведению их из организма. В отношении Республики Узбекистан нет ни одной публикации, посвященной анализу представленности

© С. Б. Бердиева, Д. С. Демина, И. Д. Осипов, Д. Е. Маслов, В. А. Васиховская, Д. С. Забелина, С. И. Рузметова, Д. А. Камолходжаев, Н. С. Ибадуллаева, А. С. Хикматуллаева, Э. И. Мусабаев, Д. Ш. Кушакова, Э. Ф. Аглетдинов, С. В. Нетёсов, 2024

серотипов циркулирующих аденовирусов на ее территории. Ранее мы разработали и валидировали схему генетического типирования аденовирусов, основанную на секвенировании вариабельной части гена поверхностного белка гексона. Мы планируем использовать эту схему для массовой оценки встречаемости различных серо- и генотипов аденовирусов, циркулирующих на территории Республики Узбекистан. На текущий момент проведены изучение и анализ встречаемости всех аденовирусов среди случаев ОРВИ/ОРЗ у пациентов Городской детской клинической больницы № 5 Ташкента, больницы для пациентов с Covid-19 Зангиота в Детском соматическом отделении № 1, 2, Центральной поликлиники Алмазорского районного медицинского объединения, Комитета санитарно-эпидемиологического мира и общественного здоровья при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан. Также были взяты и исследованы мазки, поступившие в Институт вирусологии из Андижанского филиала Комитета санитарно-эпидемиологического мира и общественного здоровья при Министерстве здравоохранения Республики Узбекистан.



Показатель ОРИ на 100 000 обслуживаемого населения, 2023/2024 гг. [1]

От добровольцев с симптомами ОРЗ взято 1664 мазка: из Городской детской клинической больницы № 5 — 185 мазков; из Детского соматического отделения № 1, 2 — 338; из Центральной поликлиники Алмазорского районного медицинского объединения — 77; Комитета санитарно-эпидемиологического мира и общественного здоровья — 946; из Института вирусологии — 118 мазков. Из них были проанализированы на наличие аденовирусов 686 мазков тест-системой РеалБест-ОРВИ ДНК hAdV/hBoV компании «Вектор-Бест», в результате обнаружена 71 положительная на аденовирусы проба. Для секвенирования была использована часть гена белка гексона, чтобы выявить серотипы положительных на аденовирусы проб с помощью ПЦР. Размножен участок гена гексона, содержащий первую вариабельную петлю. Получить ампликон участка гена гексона удалось только на 10 пробах. После чего проводилось секвенирование по Сэнгеру (на секвенаторе ABI 3500 DNA Analyzer).

Заключение

В 686 взятых проб от госпитализированных с ОРЗ пациентов в Ташкенте положительных на аденовирусы оказалось 71. Из этих проб в 10 были секвенированы фрагменты гена белка гексона. В результате были выявлены 3 пробы серотипа 7, который относится к виду B и в некоторых случаях может вызывать летальные исходы, 6 проб были 55-го серотипа, а также была обнаружена 1 проба с 6-м серотипом.

Литература

1. Еженедельный национальный бюллетень по гриппу и ОРВИ за 9 неделю 2024 года (26.02.24 — 03.03.24). URL: https://gov.uz/ru/ssv/sections/axborot-byulletenlari/view/9490/

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-177

ОЦЕНКА ВИРУСИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НАНОКАПСУЛ, СОДЕРЖАЩИХ МИРНК, НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ *

EVALUATION OF THE VIRUS INHIBITORY ACTIVITY OF SIRNA CONTAINING NANOCAPSULES ON ROTAVIRUS INFECTION CELL MODEL

А. В. Бродская[1,2], А. В. Грачева[3], А. Р. Ахметова[1,4], Д. М. Хохлова[3], Е. Р. Корчевая[3], Д. И. Смирнова[3], А. Рогова[1], Р. Джазули[1], Е. Б. Файзулоев[3]

[1] *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого*
[2] *НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург*
[3] *Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова, Москва*
[4] *Университет ИТМО, Санкт-Петербург*

A. V. Brodskaia[1,2], A. V. Gracheva[3], A. R. Akhmetova[1,4], D. M. Khokhlova[3], E. R. Korchevaya[3], D. I. Smirnova[3], A. Rogova[1], R. Djazouli[1], E. B. Faizuloev[3]

[1] *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*
[2] *Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg*
[3] *Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow*
[4] *ITMO University, Saint Petersburg*

✉ alexandra.b_05@mail.ru

Аннотация

В нашем исследовании предлагается перспективный подход к терапии ротавирусов с применением миРНК — интерференции. В результате биоинформатического анализа генов ротавируса NSP1 и NSP4 подобраны 10 потенциальных противовирусных миРНК, проведен скрининг их вирусингибирующего потенциала. Отобранная миРНК, таргетная к гену NSP4, в составе полилактидных нанокапсул продемонстрировала значимое снижение вирусной репродукции на клеточной модели инфекции.

Abstract

Our study proposes a promising approach for rotavirus therapy using siRNA interference. 10 potential antiviral siRNAs were selected as a result of bioinformatics analysis of rotavirus genes NSP1 and NSP4, and they were screened for virus-inhibitory potential. The selected siRNA targeting the NSP4 gene, in the composition of polylactide nanocapsules, demonstrated a significant decrease in viral reproduction in infection cell model.

Ротавирусы являются одной из самых частых причин возникновения острых гастроэнтеритов у детей, особенно раннего возраста. На данный момент не существует этиотропного лечения, направленного на подавление ротавирусной инфекции, а приобретенный после вакцинации (или перенесенного заболевания) иммунитет не полностью предотвращает новые случаи заболевания. Вследствие большой вариабельности белков ротавируса и высокой скорости изменчивости его генома поиск препаратов для терапии работающих на уровне белковых взаимодействий представляется малоэффективным. В нашем исследовании мы использовали более перспективный подход с применением миРНК — интерференции, позволяющей эффективно и с высокой специфичностью ингибировать вирусные гены, используя миРНК к их наиболее консервативным последовательностям.

На предварительном этапе было проведено эволюционное и биоинформатическое исследование двух генов ротавируса: NSP1 и NSP4 как потенциальных мишеней для РНК-интерференции в качестве противовирусной терапии. В результате были выявлены потенциальные области и проведен дизайн *in silico* 10 потенциальных противовирусных миРНК. Был осуществлен первичный скрининг вирусингибирующего действия данных миРНК на клеточной модели ротавирусной инфекции MA-104 в отношении штамма Wa ротавируса человека группы А, генотип G1P[8] (РВА Wa, ATCC-VR-2018). миРНК доставляли в клетки коммерческим реагентом Lipofectamine RNAiMAX (Thermofisher) по профилактической схеме за 24 ч до заражения и оценивали репродукцию вируса в течение 3 суток с определением титра по накоплению вирусной мРНК методом ОТ-ПЦР-РВ, методом ИФА

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 22-74-10117).

© А. В. Бродская, А. В. Грачева, А. Р. Ахметова, Д. М. Хохлова, Е. Р. Корчевая, Д. И. Смирнова, А. Рогова, Р. Джазули, Е. Б. Файзулоев, 2024

и оценкой ЦПД при титровании вирусного потомства. Полученные тремя методами данные свидетельствуют, что на определенных временных точках внесение миРНК приводит к подавлению репликации РВА *in vitro*. В частности, было показано однозначное и достоверное снижение вирусной репродукции более чем на 50 % для двух миРНК, таргетных к гену NSP4, через 24, 48 и 72 ч после инфицирования. В свою очередь, миРНК, таргетная к гену NSP1, проявила вирусингибирующую активность в течение первых суток после заражения по совокупности данных. В результате скрининга были отобраны 3 перспективные миРНК для оценки их противовирусной активности в составе органических полилактидных нанокапсул. Нанокапсулы как эффективные носители миРНК для внутриклеточной и пероральной доставки *in vivo* были ранее разработаны и исследованы нашим коллективом СПбПУ (данные еще не опубликованы).

Внесение препаратов миРНК в нанокапсулах проводили по профилактической схеме за 24 ч до заражения и по лечебно-профилактической схеме через 4 ч после заражения. Вирусингибирующая активность определялась также на клеточной модели MA-104 в отношении РВА Wa (3,3 $lgТЦД_{50}$/мл); в экспериментах использовались две дозы заражения MOI = 0,05 и 0,01. Параллельно было оценено влияние вирусного заражения на эффективность трансфекции с использованием флуоресцентно-меченных пустых нанокапсул и меченных нецелевых, негативных миРНК. Показано повышенное более чем в 2 раза накопление флуоресцентного сигнала в клетках с внесением препаратов по лечебно-профилактической схеме. Также было продемонстрировано, что пустые нанокапсулы и негативные миРНК при любом режиме введения способны подавлять вирусную репродукцию в клетках, по видимости, вследствие активации интерферонового ответа.

Сопоставление результатов определения вирусного антигена в клетках, накопления вирусной РНК и инфекционной активности вируса на разные сроки после заражения клеток, обработанных полилактидными нанокапсулами, не выявило выраженной противовирусной активности препаратов миРНК на 1-е сутки после заражения при разных схемах применения (лечебная, профилактическая). Через 24 и 72 ч после заражения наблюдалась тенденция к снижению вирусной репродукции и понижению титра вируса в пределах 1,5 $lgТЦД_{50}$/мл для одной из миРНК, таргетной к гену NSP4. Данная миРНК также продемонстрировала значимое снижение вирусной репродукции по сравнению с негативным контролем через 72 ч после заражения при введении по профилактической схеме и малой заражающей дозе вируса (0,01 MOI). Наблюдалось снижение вирусного титра с 7,40 $lgТЦД_{50}$/мл до значения 0, менее порога чувствительности метода.

Таким образом, была отобрана перспективная миРНК для продолжения исследований по разработке противовирусного препарата в отношении РВА. На данный момент начаты эксперименты по определению противовирусной активности препарата миРНК в составе полилактидных нанокапсул на модели ротавирусной инфекции мышей.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-178

ДЛИТЕЛЬНАЯ ПЕРСИСТЕНЦИЯ ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO

LONG-TERM PERSISTENCE OF HANTAVIRUS PUUMALA 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

Для хантавируса Пуумала, возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом, представляет интерес изучение персистенции вируса в клеточной культуре. В природе хантавирусы характеризуются хронической инфекцией основного хозяина, не влияющей на его жизнедеятельность. Мы исследовали хроническую инфекцию хантавируса Пуумала в культуре клеток Vero.

Abstract

For hantavirus Puumala, which is the causative agent of hemorrhagic fever with renal syndrome, it is of interest to study the virus persistence in cell culture. In nature, hantaviruses are characterized by a chronic infection of the main host that does not affect its vital activity. We investigated chronic infection of hantavirus Puumala in Vero cell culture.

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), вызываемая возбудителями из рода *Orthohantavirus*, занимает ведущее место среди природно-очаговых инфекций на территории РФ. Основную этиологическую роль в структуре заболеваемости ГЛПС в России занимает вирус Пуумала, вызывающий до 97 % случаев заболеваний.

Несмотря на распространенность заболевания, многие аспекты взаимодействия «вирус — хозяин», способствующие длительной и бессимптомной персистенции вируса в его естественных хозяевах (*Rodentia*), но при этом вызывающие тяжело протекающее заболевание у человека, остаются малоизученными. Известно, что хантавирус Пуумала, адаптированный к клеточной культуре Vero, не вызывает цитотоксического эффекта. Цель исследования — определение продолжительности персистенции вируса Пуумала в культуре клеток Vero при различных условиях культивирования.

Материалы и методы

Культивирование вируса Пуумала штамм PUU-TKD-VERO проводили в культуре клеток Vero. В эксперименте оценивали три варианта ведения зараженной вирусом Пуумала культуры клеток: 1 — без смены среды и пассирования (доживание); 2 — с регулярной сменой среды, но без пассирования; 3 — с пассированием каждую неделю. На каждый вариант использовали по 2 культуральных флакона площадью 25 см², с множественностью заражения — 0,02.

В качестве контроля использовали аналогичные варианты ведения чистой культуры, культивирование которых осуществлялось так же, как и зараженных. Культивирование флаконов с культурой Vero велось в CO_2-инкубаторе при t = 37 °C со сменой среды (9 мл) каждые 5–7 дней во флаконах группы 2 и с пассированием каждые 7 дней флаконов группы 3. Из флаконов регулярно отбирались пробы: культуральной жидкости из флаконов групп 1 и 2 и клеточной взвеси из флаконов группы 3. В собранных пробах количественное содержание вируса Пуумала оценивалось по титру вируса методом определения числа фокусобразующих единиц (ФОЕ/мл) в культуре клеток Vero, а также при помощи метода флуоресцирующих антител. Количество вирусной РНК определяли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

© А. Н. Ветрова, С. С. Курашова, М. С. Егорова, Т. К. Дзагурова, 2024

Результаты

Во флаконах групп 1 и 2 титр вируса достигал максимальных значений в 4,0–4,5 ± 0,3 lg ФОЕ/мл к 7-м суткам, после чего титр снижался до порога чувствительности метода (1–2 ± 0,3 lg ФОЕ/мл) к 20–23-м суткам. Количество вирусной РНК в пробах коррелировало с динамикой титра вируса. Клеточный монослой в зараженных флаконах морфологически не отличался от монослоя в контрольных флаконах для всех вариантов культивирования. Дегенерация клеточного монослоя как зараженной, так и чистой культуры наблюдалась в одни сроки: 22–23 дня для группы 1; 81–84 дня для группы 2. Заражение вирусом Пуумала не оказало никакого негативного влияния на выживаемость культуры клеток Vero.

Флаконы группы 3 были пассированы более 20 раз (исследование продолжается) без добавления незараженной культуры Vero. Титр вируса в пробах после пассажей 1–3 составлял 5,5–6,0 ± 0,3 lg ФОЕ/мл, после пассажей 4–6 — 3–4 ± 0,3 lg ФОЕ/мл, далее он находился в промежутке 0–2 ± 0,3 lg ФОЕ/мл. Количество вирусной РНК в пробах из флаконов группы 3 было в целом значительно выше, чем в пробах двух других групп, что объясняется содержанием в них зараженных клеток, из которых при пробоподготовке к ПЦР также выделяется РНК. Количество копий было максимальным на втором и третьем пассажах ($1{,}56*10^7$ и $1{,}93*10^7$ копий РНК/мл), после чего снижалось до показателей 2×10^5–4×10^5 копий РНК/мл. Наблюдалась волнообразная динамика с возрастанием количества РНК на пассажах 9, 14, 16, и 18, которое также сопровождалось возрастанием и титра вируса в пробах (до 3–3,5 ± 0,3 lg ФОЕ/мл).

Заключение

Многократное пассирование культуры клеток Vero, зараженной вирусом Пуумала, без добавления незараженных клеток позволило нам установить наличие длительной персистенции вируса за счет цикличности его репродукции (пиковые значения сменяются депрессией).

Прямая зависимость содержания вируса и количества копий вирусной РНК в культуральной жидкости и клетках объясняется достаточной ресурсной базой клеток на ранних этапах инфекции. В дальнейшем при постепенном истощении ресурсов клеток отмечается нарастание вирусной РНК, но созревание вируса не происходит: по-видимому, предпочтение отдается синтезу клеточных белков. Таким образом, для поддержания персистирующей инфекции тормозится созревание вируса, что сохраняет жизнедеятельность «хозяина», в данном случае — клеточной культуры.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-179

ПОИСК МУТАЦИЙ ВГВ, ПОТЕНЦИАЛЬНО СВЯЗАННЫХ С ВЫСОКИМ РИСКОМ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ И ГЦК ПРИ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В

THE SEARCH FOR HBV MUTATIONS POTENTIALLY ASSOCIATED WITH A HIGH RISK OF LIVER CIRRHOSIS AND HCC IN VIRAL HEPATITIS B

А. Г. Глущенко, М. Д. Чанышев, Н. В. Власенко, В. В. Макашова, К. Ф. Хафизов

Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва

A. G. Glushchenko, M. D. Chanyshev, N. V. Vlasenko, V. V. Makashova, K. F. Khafizov

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

✉ albinagluschenko@gmail.com

Аннотация

В работе была получена и проанализирована коллекция полногеномных последовательностей вируса гепатита В. В результате был определен ряд однонуклеотидных мутаций, которые могут быть связаны с высоким риском возникновения цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

Abstract

In this work, a collection of whole-genome sequences of Hepatitis B virus was obtained and analyzed. As a result, a number of mutations have been associated with a high risk of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma.

Гепатит В, заболевание печени, вызываемое вирусом гепатита В (ВГВ), остается глобальной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2022 г. насчитывалось около 254 млн человек с диагнозом «хронический гепатит В» (ХГВ), при этом в том же году количество смертельных исходов составило около 1,1 млн. Основными осложнениями ХГВ являются патологические изменения печеночной ткани с развитием фиброза, цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). В многочисленных исследованиях сообщается, что на течение заболевания и его исходы могут оказывать влияние мутации вируса гепатита В [1].

Цель настоящей работы — определение мутаций ВГВ, потенциально связанных с развитием цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

В клиническое исследование, осуществляемое на базе ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (ЛЭК № 133 от 02.03.2023), было включено 128 взрослых участников с лабораторно подтвержденным вирусным гепатитом. Пробоподготовка проводилась с помощью разработанной нами амплификационной панели HBV-seq для полногеномного секвенирования ВГВ [2]. Секвенирование выполнялось на платформе Illumina Miseq. Для поиска взаимосвязей между мутациями и наличием осложнений использовался точный тест Фишера. Также полученные мутации были проанализированы с помощью логистической регрессии и градиентного бустинга XGBoost.

В результате была получена коллекция ДНК ВГВ, средний процент покрытия генома ВГВ составил 93 %. При этом 60 образцов были прочитаны на 100 %. Наиболее распространенным подтипом в исследуемой выборке является D1 (n = 73). Подтипы D2, D3, A2, C1, B1 определены в 26, 17, 10, 1, 1 случаях соответственно.

Мутации, ассоциированные с ЦП и ГЦК, были отобраны по статистической значимости ($p < 0{,}01$). Положительную взаимосвязь с риском появления ЦП показали мутации 111C>A (S-protein P160H), 1023C>A, 2011C>G, 2119T>C, 2242G>A, 2594A>G, а для мутаций 1082A>G (P-protein K677R) и 1134C>T была обнаружена отрицательная корреляция. Среди пациентов с ГЦК чаще встречались мутации 150T>G (preS2 region L54R), 286A>G (P-protein rtN53D), 289T>G (P-protein rtY54D), 373C>T, 472T>A (P-protein rtL115M), 773A>C (P-protein rtQ215P, S-protein S392R), 918T>A (P-protein rtD263E), 1484C>A (P-protein S787Y), 2594A>G, 3060A>G (P-protein T239A, S-protein T81A). Стоит отметить, что некоторые мутации уже упоминались в литературных данных в связи с ГЦК. Например, замена rtQ215P в вирусной полимеразе была отмечена у двух пациентов с ГЦК в работе из Южной Кореи [3]. А мутация в нуклеотидной позиции 3060 была ассоциирована с риском ГЦК в работе из Китая [4]. При анализе методами машинного обучения наибольшую значимость показали мутации 111C>A при циррозе печени и 773A>C, 1484C>A при ГЦК.

© А. Г. Глущенко, М. Д. Чанышев, Н. В. Власенко, В. В. Макашова, К. Ф. Хафизов, 2024

Таким образом, в настоящей работе была получена и исследована коллекция образцов ДНК ВГВ. Были обнаружены мутации ВГВ, которые могут быть связаны с риском появления таких исходов вирусного гепатита, как ЦП и ГЦК.

Исследование генома ВГВ и определение мутаций, ассоциированных с высоким риском развития ЦП и ГЦК, может иметь как фундаментальное, так и прикладное значение. Полученные данные расширяют понимание патогенеза ВГВ и его влияния на организм человека. В то же время с практической точки зрения на основе обширной базы таких мутаций становится возможным определять группу риска среди инфицированных. Это способствует развитию персонализированной медицины в России, когда при диагностике и лечении заболевания в расчет в том числе принимается и геном вируса конкретного пациента.

Литература

1. Tong S., Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability // J. Hepatol. 2016. Vol. 64, No. 1 Suppl. P. S4–S16.

2. Чанышев М. Д. и др. Амплификационная панель NGS для секвенирования ДНК вируса гепатита B (Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus) // Вопросы вирусологии. 2024. Vol. 69, No. 1. P. 65–75.

3. Kim J. E. et al. Naturally occurring mutations in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus polymerase from treatment-naïve Korean patients infected with genotype C2 // World J. Gastroenterol. 2017. Vol. 23, No. 23. P. 4222–4232.

4. Xie J. X. et al. Association of novel mutations and haplotypes in the preS region of hepatitis B virus with hepatocellular carcinoma // Front Med China. 2010. Vol. 4, No. 4. P. 419–429.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-180

ТОКСИЧНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ИХ ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА SARS-COV-2 *

TOXICITY OF ESSENTIAL OILS AND THEIR ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST THE SARS-COV-2 VIRUS

Т. А. Гостева, В. В. Солодкий, В. В. Золин, О. П. Оськина

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

T. A. Gosteva, V. V. Solodky, V. V. Zolin, O. P. Os'kina

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ gosteva_ta@vector.nsc.ru

Аннотация

Эфирные масла некоторых растений применяются в медицине как противовоспалительные, иммуномодулирующие, антимикробные и противовирусные средства. В природе эфирные масла выполняют функции защиты растений от вредителей, бактерий, вирусов, а также от низких и высоких температур [1–3].

Abstract

Essential oils of some plants are used in medicine as anti-inflammatory, immunomodulatory, antimicrobial and antiviral agents. Natural essential oils perform the functions of protecting plants from pests, accidents, viruses, as well as from low and high temperatures [1–3].

Введение

Научными исследованиями, приведенными в литературных источниках, было показано, что эфирные масла активны против широкого спектра вирусов, таких как вирус гриппа (IFV), A1 / Denver / 1/57 (H1N1), вирусы герпеса человека (HSV-1 и HSV-2), вирус иммунодефицита человека, вирус желтой лихорадки и птичий грипп [4–7]. Мощным действием против тяжелого острого респираторного синдрома, вызываемого коронавирусом SARS-CoV-2, обладают растительные дитерпеноиды абиетинового типа. По имеющимся данным известно, что эти соединения входят в химический состав хвойных растений [8]. Но эфирные масла не столь безобидны, их природная концентрация составляет 0,1–0,5 мг/м^3, а токсикологически безопасная концентрация — до 5 мг/м^3 [9].

Цель работы — сравнительное изучение токсического воздействия эфирных масел на культуру клеток Vero E6, а также сравнительная оценка противовирусной активности эфирных масел, проведенная авторским методом бесконтактного воздействия.

Материалы и методы

Была проведена проверка токсичности выбранных эфирных масел в диапазоне двукратных разведений и определена концентрация для каждого из них (LC 50). Для этого разведения исследуемых веществ вносили в монослойную культуру клеток Vero E6 в 96-луночных планшетах по 0,1 см^3 в лунку. Учет проводили в течение 5 суток. Следующим этапом исследования являлся подбор нейтрализатора для эфирных масел. По результатам экспериментов самым эффективным оказался универсальный нейтрализатор — сыворотка крупного рогатого скота (КРС) 80 %. Результаты токсикологических исследований представлены в таблице.

Противовирусную активность эфирных масел в отношении вируса SARS-CoV-2 исследовали с использованием уханьского геноварианта, титр 6,25 ± 0,3 lgТЦД 50/см^3. Метод бесконтактного воздействия эфирных масел заключается в том, что на дно стерильной пластиковой чашки Петри наносили исследуемые эфирные масла в количестве 0,3 см^3, а вирусную суспензию наносили на внутреннюю поверхность крышки чашки Петри в объеме 0,1 см^3, затем подсушивали для исключения стекания. Экспериментальные образцы экспонировали при 37 ± 0,1 °С 180 мин. После воздействия паров эфирных масел на вирус (без прямого контакта) производили

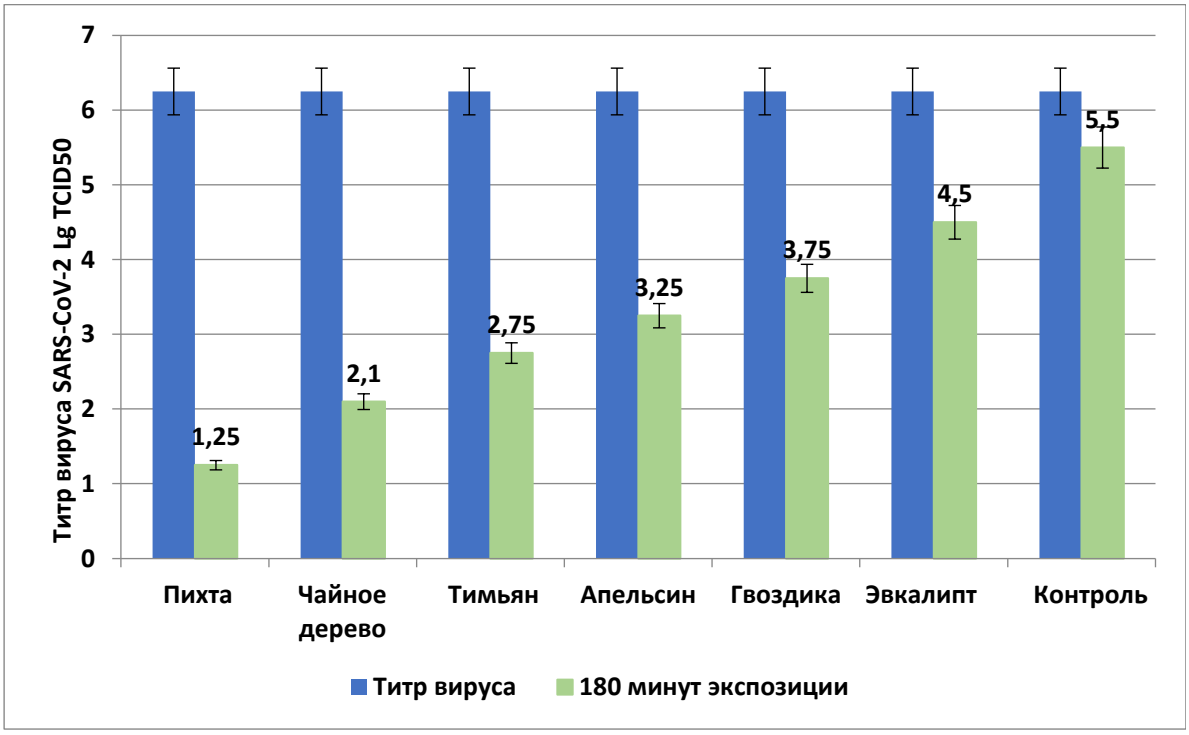
* Исследование выполнено в рамках гос. задания (№ 46/21).

© Т. А. Гостева, В. В. Солодкий, В. В. Золин, О. П. Оськина, 2024

смывы с поверхности крышки чашки и титровали в культуре клеток. Все эксперименты сопровождались контролями: культуры клеток, исходного вируса, полноты нейтрализации. Результаты исследования представлены на рисунке.

Определение цитотоксичности и нейтрализации токсичности эфирных масел для монослоя клеток Vero E6 в диапазоне двукратных разведений при их дальнейшем культивировании в течение 5 суток

Наименование эфирного масла	Цитотоксичность концентраций эфирных масел, %									
	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,10	LC50	LC50 КРС 80 %
Пихта	++++	++++	++++	++++	++00	0000	0000	0000	0,78	4,67
Чайное дерево	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0000	0,13	0,13
Тимьян	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0000	0,13	0,13
Апельсин	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0000	0,13	0,13
Гвоздика	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++00	0000	0,18	0,37
Эвкалипт	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++00	0000	0,18	0,37
Контроль клеток	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		



Определение остаточной инфекционной активности вируса SARS-CoV-2 (уханьский геновариант) по ТЦД 50 (TCID50) после воздействия эфирных масел при температуре 37 ± 0,1 °С 180 мин

Таким образом, по результатам токсикологических исследований эфирное масло пихты показывает наименьшую токсичность, равную 0,78 % (LC 50).

Выводы

Результаты вирусологических исследований показывают наличие противовирусной активности *in vitro* у всех исследованных эфирных масел в отношении вируса SARS-CoV-2 (уханьский геновариант). Самым вирулицидным и наименее токсичным из исследованных образцов эфирных масел оказалось эфирное масло пихты. Исследования в этом направлении будут продолжены.

Литература

1. Сигачева И. О. Влияние эфирных масел на организм человека // Молодой ученый. 2022. № 29 (424). С. 4–8. URL: https://moluch.ru/archive/424/94055/.

2. Войткевич С. А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. М.: Пищевая промышленность, 1999. 284 с.

3. Шелехина С. В., Трубенкова Т. И. Антибактериальное действие эфирных масел различного производства // Юный ученый. 2017. № 1 (10). С. 113–115. URL: https://moluch.ru/young/archive/10/756/

4. Ma L., Yao L. Antiviral effects of plant-derived essential oils and their components: an updated review // Molecules. 2020. Vol. 25.

5. Vimalanathan S., Hudson J. Anti-influenza virus activity of essential oils and vapors // Am. J. Essent. Oil Nat. Prod. 2014. Vol. 2. P. 47–53.

6. Schuhmacher A., Reichling J., Schnitzler P. Virucidal effect of eucalyptus oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro // Phytomedicine. 2003. Vol. 10. P. 504–510.

7. Чижикова О. В., Возгорькова Е. О. Ароматерапия // Междунар. студ. науч. вестн. 2021. № 2. URL: https://eduherald.ru/ru/article/view?id=20582

8. Чихун Вен и др. Специфические растительные терпеноиды и лигноиды обладают мощной противовирусной активностью в отношении коронавируса с тяжелым остым респираторным синдромом // J. Med. Chem. 2007. Vol. 50 (17). P. 4087–4095.

9. Казаринова Н. В., Музыченко Л. М., Ткаченко К. Г. и др. Использование эфирных масел для профилактики внутрибольничных инфекций и лечения кандидозов // Мед. технологии. 1995. № 1–2. С. 23.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-181

РЕЗУЛЬТАТЫ ДЕСЯТИЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА У ДИКИХ ПТИЦ*

RESULTS OF TEN-YEARS OF MONITORING OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS IN WILD BIRDS

А. А. Дёрко[1], Н. А. Дубовицкий[1], А. М. Логинова[1], А. В. Глущенко[1], Т. А. Мурашкина[1], А. В. Прокудин[2], Е. В. Шемякин[3], М. Р. Кабилов[4], К. А. Шаршов[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Научно-исследовательский институт сельского хозяйства и экологии Арктики СО РАН, Норильск*
[3] *Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Якутск*
[4] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*

A. A. Derko[1], N. A. Dubovitskiy[1], A. M. Loginova[1], A. V. Glushchenko[1], T. A. Murashkina[1], A. V. Prokudin[2], E. V. Shemyakin[3], M. R. Kabilov[4], K. A. Sharshov[1]

[1] *Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Research Institute of Agriculture and Ecology of the Arctic SB RAS, Norilsk*
[3] *Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, Yakutsk*
[4] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*

✉ a.derko19@gmail.com

Аннотация

Вирус болезни Ньюкасла (ВБН) — это патоген птиц, представляющий угрозу для птицеводства и биоразнообразия видов. В этом исследовании мы сообщаем о результатах десятилетнего мониторинга в популяциях диких птиц нескольких регионов РФ. В результате были получены и охарактеризованы 122 полногеномные последовательности ВБН. 73 изолята принадлежали генетической линии Class I, 49 — Class II. Среди вирусов Class II был обнаружен высокопатогенный изолят генотипа VII.

Abstract

Newcastle disease virus (NDV) is an avian pathogen that poses a threat to the poultry farming and species biodiversity. In this study, we report the results of ten-years of monitoring in wild bird populations in several regions of Russia. As a result, 122 whole genome sequences of NDV were obtained and characterized. 73 isolates belonged to the Class I genetic lineage, 49 to Class II. Among Class II viruses, a highly pathogenic isolate of genotype VII was detected.

Вирус болезни Ньюкасла (вид *Orthoavulavirus javaense*, сем. *Paramyxoviridae*; также известный как *Avian paramyxovirus* 1 (APMV-1)) вызывает заболевание различной степени тяжести у диких и домашних птиц. За почти столетнюю историю исследований ВБН разные генетические варианты вируса становились причиной 4 панзоотий со значительными экономическими последствиями [1]. В последние три десятилетия в России и мире циркулируют несколько патогенных генотипов ВБН, которые, несмотря на обязательную вакцинацию и другие профилактические меры, вызывают вспышки заболевания с высокой смертностью. На данный момент остается неясной картина глобальной циркуляции вируса. Однако предполагают, что разные экологические группы диких птиц могут выступать как в качестве природных резервуаров для некоторых генотипов, так и в качестве звена в передаче патогенных генотипов. Поэтому целью данного исследования является оценка генетического разнообразия и потенциальной патогенности изолятов, полученных от диких птиц нескольких регионов РФ.

Более 8 тысяч клоакальных мазков от различных видов диких птиц были собраны в период с 2013 по 2021 г. в рамках мониторинга вируса гриппа А. Сбор осуществляли на территории 11 регионов России: в Омской, Новосибирской, Амурской и Сахалинской областях, Республиках Тыва, Бурятия, Якутия и Дагестан, в Красноярском, Камчатском и Приморском краях. Также в 2014 г. пробы были собраны в Павлодарской области Республики Казахстан.

Собранные образцы подготавливали для инокуляции в аллантоисную полость развивающихся куриных эмбрионов с использованием стандартных методов [2]. Затем аллантоисная жидкость была проверена на нали-

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 23-44-00026).

© А. А. Дёрко, Н. А. Дубовицкий, А. М. Логинова, А. В. Глущенко, Т. А. Мурашкина, А. В. Прокудин, Е. В. Шемякин, М. Р. Кабилов, К. А. Шаршов, 2024

чие гемагглютинирующих агентов [3]. Все образцы с гемагглютинирующей активностью были использованы в ПЦР-тестировании для выявления РНК вирусов семейства *Paramyxoviridae* по описанной методике [4]. После чего устанавливали полногеномные последовательности изолятов методом секвенирования нового поколения на платформе MiSeq (Illumina, США), как описано ранее [5]. Филогенетический анализ и сравнительный анализ аминокислотных последовательностей проводили при помощи ПО MEGA X.

В ходе исследования было получено 122 полногеномные последовательности ВБН от диких птиц (отряды *Anseriformes*, *Charadriiformes*, *Galliformes* и *Gruiformes*). В результате филогенетического анализа было установлено, что 73 изолята принадлежали генетической линии Class I, 49 изолятов — генетической линии Class II. Большая часть изолятов (n = 121) была представлена низкопатогенными вариантами и содержала сайт расщепления белка F 112-ERQER↓L-117. Пять изолятов, полученные от чаек в 2014 и 2020 г., оказались филогенетически близкими со штаммами субгенотипа I.1.2.1 (генетическая линия Class II, генотип I) и сформировали отдельную кладу на филогенетическом дереве. Ранее эта клада была представлена тремя штаммами, которые были обнаружены у чаек и околоводной птицы того же отряда (отряд *Charadriiformes*) в Швеции в 1994 г., США в 2001 г. и в Японии в 2009 г. Изоляты, полученные в ходе нашего исследования, были выявлены у чаек в Республике Тыва и на полуострове Таймыр. Редкость выявления и широкий географический диапазон может говорить о существовании отдельного субгенотипа, который циркулирует только в популяции чаек, как было показано для двух субтипов по гемагглютинину вируса гриппа А [6, 7].

Среди вирусов Class II был выявлен высокопатогенный изолят с сайтом расщепления 112-RRQKR↓F-117, относящийся к генотипу VII. Об обнаружении вирусов данного генотипа сообщалось по всему миру. В настоящее время генотип VII представлен генетически гетерогенными штаммами с возникающими новыми линиями и обладает наибольшим панзоотическим потенциалом [8]. Данный генотип на территории РФ выявлялся только у домашних птиц [9, 10]. В ходе нашего исследования изолят был получен от фазана (*Phasianus colchicus*) в Республике Дагестан в 2018 г. Интересно, что первые случаи обнаружения вирусов генотипа VII описаны в 1990-х гг. в Китае и выявлены они были также у фазанов (род *Phasianus*).

Обнаруженная нами циркуляция ВБН высокопатогенного генотипа VII в популяциях фазанов может указывать на активную роль диких курообразных (отряд *Galliformes*) в распространении этого вируса.

Литература

1. Dimitrov K. M. et al. Newcastle disease vaccines — A solved problem or a continuous challenge? // Veterinary Microbiol. 2017. Vol. 206. P. 126–136.

2. Avian Influenza — WOAH — World Organisation for Animal Health. URL: https://www.woah.org/en/disease/avian-influenza/ (accessed: 10.07.2024).

3. Killian M. L. Hemagglutination assay for influenza virus // Methods Mol. Biol. 2014. Vol. 1161. P. 3–9.

4. van Boheemen S. et al. A Family-Wide RT-PCR Assay for Detection of Paramyxoviruses and Application to a Large-Scale Surveillance Study // PLoS ONE / ed. W. Markotter 2012. Vol. 7, No. 4. P. e34961.

5. Murashkina T. et al. Avian Influenza Virus and Avian Paramyxoviruses in Wild Waterfowl of the Western Coast of the Caspian Sea (2017–2020): 4 // Viruses. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2024. Vol. 16, No. 4. P. 598.

6. Benkaroun J. et al. Analysis of influenza A viruses from gulls: An evaluation of inter-regional movements and interactions with other avian and mammalian influenza A viruses // Cogent Biology. 2016. Vol. 2 (1).

7. Huang Y. et al. Perpetuation and reassortment of gull influenza A viruses in Atlantic North America // Virology. 2014. Vol. 456–457. P. 353–363.

8. Dimitrov K. M. et al. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus) // Infection, Genetics and Evolution. 2016. Vol. 39. P. 22–34.

9. Guseva N. A. et al. Analysis of Avian Orthoavulavirus 1 Detected in the Russian Federation between 2017 and 2021: 6 // Vaccines. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2023. Vol. 11, No. 6. P. 1032.

10. Rtishchev A. et al. An Outbreak of Newcastle Disease Virus in the Moscow Region in the Summer of 2022: 6 // Veterinary Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. 2023. Vol. 10, No. 6. P. 404.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-182

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ПОЛИОМИЕЛИТА ШТАММОВ СЭБИН ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЫ

OBTAINING MONOCLONAL ANTIBODIES TO POLIOVIRUS STRAINS SABIN FOR THE DEVELOPMENT OF AN ELISA TEST SYSTEM

М. Ю. Ермакова, С. В. Иванов, А. А. Шишова, А. А. Синюгина

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва

M. Yu. Ermakova, S. V. Ivanov, A. A. Shishova, A. A. Sinyugina

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

✉ ermakova_mj@chumakovs.su

Аннотация

Полиомиелит — острое инфекционное заболевание, вызываемое полиовирусом. В качестве профилактики полиомиелита применяют два вида вакцин: оральную (живую) полиомиелитную вакцину и инактивированную полиомиелитную вакцину [1]. Для проверки иммуногенности вакцинных препаратов существует необходимость в разработке высокоспецифичной ИФА тест-системы, которая позволит проводить внутритиповую дифференциацию полиовирусов.

Abstract

Poliomyelitis is an acute infectious disease caused by the poliovirus. Two types of vaccines are used to prevent poliomyelitis: oral (live) polio vaccine and inactivated polio vaccine [1]. To test the immunogenicity of vaccine preparations, there is a need to develop a highly specific ELISA test system that will allow for intratype differentiation of polioviruses.

Инактивированная полиомиелитная вакцин включает в себя три антигенных компонента (D-антигена), соответствующие трем типам полиовируса (1, 2 и 3). D-антиген способствует выработке нейтрализующих антител, и именно его наличие обуславливает иммуногенные свойства вакцины. Количественное содержание D-антигена, определяемое с помощью ИФА, а также в реакции нейтрализации, применяется для оценки образцов при производстве каждой новой партии вакцин. Однако при анализе результатов не всегда наблюдается стабильная корреляция, что может быть связано с использованием поликлональных антител, снижающих чувствительность метода и увеличивающих риск перекрестной реактивности. В связи с этим цель исследования — получение моноклональных «верблюжьих» антител, специфичных к нейтрализующим сайтам трех типов D-антигена вируса полиомиелита штамма Сэбин.

Одним из современных подходов к созданию таких антител является метод фагового дисплея, позволяющий экспрессировать чужеродный белок на поверхности бактериофага [2]. На первом этапе работы был получен и очищен в цезиевом градиенте D-антиген вируса полиомиелита 1, 2 и 3-го серотипов. Очищенным антигеном иммунизировали альпак, лимфоциты которых послужили материалом для выделения пулов суммарной РНК. Далее были получены ДНК-фрагменты, кодирующие различные варианты антител, которые клонировали в фагмидный вектор в единую рамку считывания с геном, кодирующим белок p3 бактериофага M13. Таким образом, были получены библиотеки бактериофагов, содержащих последовательности антител VHH (*Variable domain of the Heavy chain of the Heavychain antibody*).

На втором этапе для отбора целевых антител проводили процедуру биопэннинга, основанного на повторяющихся циклах инкубации, промывки, трансформации и повторной селекции связанного фага. После иммуноферментного анализа и секвенирования по Сенгеру были отобраны несколько клонов, несущих в себе гены антител, специфичных к D-антигену полиовируса 1, 2 и 3-го типов. Для 1-го и 3-го типа была произведена наработка и очистка целевых антител. Для подтверждения способности VHH антител специфично связывать D-антиген вируса полиомиелита штаммов Сэбин проводили ИФА в сэндвич-варианте, где в иммунопанелях, сорбированных поликлональными кроличьими антителами к вирусу полиомиелита, инкубировали образцы D-антигена вируса Сэбин 1, 2 и 3-го типов. Детекцию проводили полученными VHH с инкубацией в антителах Anti-6x His-Tag, конъюгированных с пероксидазой. Рекомбинантные антитела также оценивали в реакции нейтрализации вируса

© М. Ю. Ермакова, С. В. Иванов, А. А. Шишова, А. А. Синюгина, 2024

полиомиелита трех серотипов штамма Сэбин. В результате была доказана специфичность полученных моноклональных антител к D-антигену полиовируса соответствующего штамма Сэбин.

Литература

1. Sabin A., Boulger L. History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains // J. Biol. Standardization. 1973. Vol. 1, No. 2. P. 115–118.

2. Smith G. Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface // Science. 1985. Vol. 228. P. 1315–1317.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-183

НОВЫЙ ИНГИБИТОР НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА — 6-ЗАМЕЩЕННОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ПУРИНА *

NEW 6-SUBSTITUTED PURINE DERIVATIVE AS INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE INHIBITOR

Я. Л. Есаулкова[1], В. В. Зарубаев[1], В. П. Краснов[2]

[1] *Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера*
[2] *Институт органического синтеза им. Постовского УрО РАН, Екатеринбург*

I. L. Esaulkova[1], V. V. Zarubaev[1], V. P. Krasnov[2]

[1] *Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg*
[2] *Postovsky Insititute of Organic Synthesis UB RAS, Yekaterinburg*

✉ IanaEsaulkova@gmail.com

Аннотация

Вирус гриппа вызывает респираторную инфекцию, распространение которой ведет к возникновению ежегодных эпидемий. В эпидемическом процессе принимают участие вирусы гриппа одного из двух типов: А или В. Чтобы избежать появления новых штаммов вируса, резистентных ко всем доступным препаратам, необходима разработка новых противовирусных препаратов. В данном исследовании был расшифрован механизм противогриппозного действия нового производного пурина.

Abstract

Influenza virus causes a respiratory infection, which leads to annual epidemics. One of two influenza virus types takes part in the epidemic process: type A or type B. To avoid the emergence of new strains of the virus that are resistant to all available drugs, the development of new antiviral drugs is necessary. In this study, the mechanism of the anti-influenza activity of a new purine derivative was deciphered.

Цель исследования — поиск вирусной мишени нового класса противогриппозных препаратов — 6-замещенных производных пурина.

Материалы и методы

В работе были использованы новые производные пурина, синтезированные в Институте органического синтеза им. Постовского УрО РАН (см. рисунок). В исследование вошла рацемическая смесь двух энантиомеров 6-замещенного производного пурина и каждый из энантиомеров по отдельности. Противовирусная активность соединений была показана нами в более ранних исследованиях.

В экспериментах использовали два вируса гриппа: вирус гриппа типа А, штамм A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), и вирус гриппа типа В, B/Malaysia/2506/04 (Victoria lineage). Исследование проводили с использованием клеточной культуры, пермиссивной по отношению к вирусам гриппа — MDCK (клетки почки собаки Мадин-Дарби).

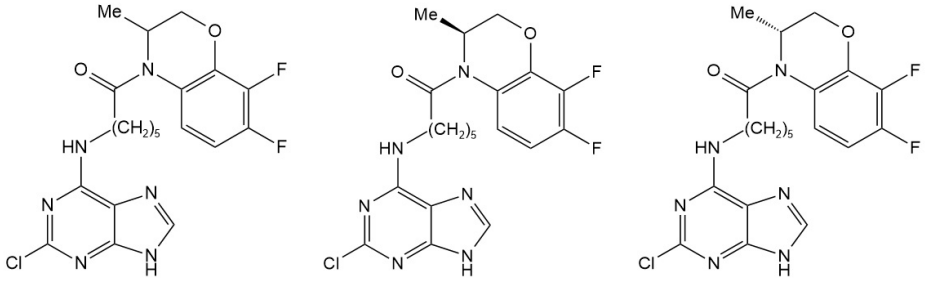
Для выявления стадии репликативного цикла вируса, на которой соединение воздействует на вирус, проводили тест на время добавления. Для этого клетки рассеивали на 24-луночные и 96-луночные планшеты. Клетки в 24-луночных планшетах заражали одинаковой дозой вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), после чего добавляли к клеткам в разных лунках препарат в соответствующих временных точках: за час до заражения, одновременно с заражением, через 2, 4 и 6 ч после заражения. В норме на 8 ч после заражения репликативный цикл вируса гриппа заканчивается выходом из клеток вирусного потомства, поэтому, чтобы зафиксировать наличие и количество новых вирионов, через 8 ч после заражения из лунок отбирали супернатант. Полученные пробы титровали в 96-луночных планшетах с клетками, титры вируса в пробах сравнивали с пробой из контрольной лунки, в которую препарат не добавляли.

Для выявления вирусного белка, который мог бы являться мишенью препарата, было проведен флюоресцентный тест с использованием реагента MUNANA [1], с помощью которого можно оценить наличие у соединений способности ингибировать вирусную нейраминидазу (NA). Принцип теста заключается в том, что NA расщепляет 2’-(4-метилумбеллиферил)-α-D-N-ацетилнейраминовую кислоту (MUNANA) с высвобождением флуоресцентного

* Исследование выполнено в рамках гос. задания Министерства науки и высшего образования РФ (темы № 121030200272-6, 124020200038-6 и 124020500044-4).

© Я. Л. Есаулкова, В. В. Зарубаев, В. П. Краснов, 2024

продукта. Воздействие ингибитора на NA вируса гриппа определяют на основе 50 % ингибирующей концентрации (IC_{50}) — концентрации ингибитора NA, необходимой для снижения 50 % активности NA [2]. Для данного теста использовали вирусы гриппа двух типов: A и B.



CEN-1530 CEN-1604 CEN-1614

Химические формулы соединений с шифрами

Результаты и обсуждение

На каждой стадии жизненного цикла вируса задействованы конкретные вирусные белки, поэтому по результатам теста на время добавления можно предположить, какой из них ингибируется препаратом. В случае исследованных соединений вне зависимости от времени добавления препарата титр вируса снижался с 6–7 до 3,5–5,5 lgTCID50, что говорит об активности препаратов вплоть до последних стадий репликативного цикла вируса. На заключительном этапе жизненного цикла вируса задействована NA — белок вируса гриппа, обеспечивающий отпочковывание вирионов, поэтому, предположительно, препарат воздействует на активность именно этого белка.

Чтобы подтвердить ингибирующую активность соединений против вирусной NA, их протестировали с помощью флуоресцентного теста MUNANA. Было показано, что ингибирующие NA свойства проявляют рацемат CEN-1530 (IC_{50} = 26 мг/мл против A/Puerto Rico/8/34, против IC_{50} = 83 мг/мл B/Malaysia/2506/04) и один из энантиомеров CEN-1614 (IC_{50} = 18 мг/мл против A/Puerto Rico/8/34, IC_{50} = 57 мг/мл против B/Malaysia/2506/04), в то время как энантиомер CEN-1604 оказался не активен против NA (IC_{50} > 300 мг/мл против A/Puerto Rico/8/34 и против B/Malaysia/2506/04). Из этих данных следует, что антинейраминидазную активность проявляет только энантиомер CEN-1614. Это подтверждается не только отсутствием активности CEN-1604, но и почти двукратным снижением IC_{50} при выделении CEN-1614 из рацемической смеси.

Выводы

Новые 6-замещенные производные пурина проявляют активность на поздних стадиях репликативного цикла вируса гриппа. Один из энантиомеров рацемической смеси воздействует напрямую на NA вирусов гриппа A и B.

Литература

1. Potier M., Mameli L., Bélisle M. et al. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-α-d-N-acetylneuraminate) substrate // Anal. Biochem. 1979. Vol. 94. P. 287–296.

2. Leang S. K., Hurt A. C. Fluorescence-based Neuraminidase Inhibition Assay to Assess the Susceptibility of Influenza Viruses to The Neuraminidase Inhibitor Class of Antivirals // J. Visualized Exp. Vol. 122. 55570.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-184

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАНТНЫХ ФОРМ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ*

THE PREVALENCE OF MUTANT FORMS OF HEPATITIS B VIRUS CIRCULATING IN SIBERIA

А. С. Железнова, М. Ю. Карташов, К. А. Свирин

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

A. S. Zheleznova, M. Yu. Kartashov, K. A. Svirin

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ zheleznova_as@vector.nsc.ru

Аннотация

Было получено 55 полногеномных последовательностей вируса гепатита В, которые были генотипированы и проанализированы на предмет наличия мутаций лекарственной резистентности и вакцинного ускользания. Выявлено следующее распределение субгенотипов в изучаемой выборке: D2 — 33,0 %; D3 — 31,0; D1 — 29,0; A2 — 7,0 %. Мутации лекарственной устойчивости среди выявленных изолятов не обнаружены. У единичного изолята обнаружена вакцинн-ускользающая мутация Y134H.

Abstract

55 full-genome HBV sequences were obtained, which were genotyped and analyzed for the presence of drug resistance and vaccine escape mutations. The following distribution of subgenotypes was revealed in the studied sample: D2 — 33.0 %, D3 — 31.0 %, D1 — 29.0 %, A2 — 7.0 %. Mutations of drug resistance were not found among the identified isolates. A vaccine-elusive mutation Y134H was found in a single isolate.

Введение

Инфекция вирусом гепатита В (ВГВ-инфекция) остается одной из самых важных проблем здравоохранения. По оценкам ВОЗ, в 2022 г. в мире насчитывалось 254 млн лиц с хроническим гепатитом В; при этом ежегодно умирают более 1 млн человек, главным образом вследствие вызываемых ВГВ осложнений — цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Несмотря на достигнутые успехи превентивных мер (разработка рекомбинантной вакцины против ВГВ и ее применение в массовой вакцинации), ВГВ-инфекция не может быть побеждена. Геном ВГВ состоит из частично двуцепочечной кольцевой ДНК протяженностью приблизительно 3200 нуклеотидов и представлен генами S, P, C и X, кодирующими за счет перекрывающихся открытых рамок считывания 7 белков. Из-за биологических особенностей ВГВ и использования в своем жизненном цикле собственной полимеразы без последующей коррекции резко повышается частота мутаций при репликации данного вируса. Возникающие мутации в P-регионе могут приводить к развитию лекарственной резистентности к существующей терапии аналогами нуклеозидов (ингибиторы вирусной полимеразы). Мутации S-региона, затрагивающие а-детерминанту HBsAg ВГВ, могут привести к снижению связывания поствакцинных антител с ВГВ и, как следствие, к иммунному ускользанию. Высокая гетерогенность ВГВ, для которого в настоящее время описаны 10 генотипов и более 40 субгенотипов, определяет степень прогрессирования заболевания и чувствительность к терапии.

Цель работы — получение полноразмерных последовательностей генома и молекулярно-генетическая характеризация генетических вариантов вируса гепатита В, циркулирующих на территории Сибири (Новосибирская область, Республика Горный Алтай, Республика Саха (Якутия)).

Материалы и методы

В ходе исследования было получено и проанализировано 55 полногеномных последовательностей изолятов ВГВ. Высокопроизводительное секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq путем таргетного обогащения разработанными нами олигонуклеотидными праймерами на полный геном ВГВ. Полученные последовательности ВГВ были проанализированы для определения их генотипов, наличия возможной лекарственной

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ГЗ-2/22 (№ 122040600156-3 в ЕГИСУ НИОКТР).

© А. С. Железнова, М. Ю. Карташов, К. А. Свирин, 2024

устойчивости и мутаций ускользания от иммунитета с использованием следующих онлайн-инструментов: hiv-grade.de, hbv.geno2pheno.org, hbvdb.lyon.inserm.fr

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решением этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 21.07.2022).

Результаты и обсуждение

Большинство выявленных изолятов ВГВ относятся к генотипу D, доминирующему в России. Также обнаружено 4 изолята, относящихся к генотипу A. (Все они обнаружены в Республике Саха, Якутия.) Распределение субгенотипов в изучаемой выборке имеет следующие особенности: D2 — 33,0 % (18/55; 95 % ДИ 21,8–45,9); D3 — 31,0 % (17/55; 95 % ДИ 20,3–44,1); D1 — 29,0 % (16/55, 95 % ДИ 18,7–42,1); A2 — 7,0 % (4/55; 95 % ДИ 2,8–17,2). Мутации лекарственной устойчивости и мутации среди выявленных изолятов не обнаружены. Выявлены следующие вакцинно-ускользающие мутации: Y134H у одного геновариантa ВГВ, а также мутации в позициях 128 и 129. Мутации A128V и Q129H не описаны в литературе, однако они находятся в пределах a-детерминанты HBsAg ВГВ, следовательно, могут приводить к развитию ускользания от иммунного ответа.

Заключение

Генетическое разнообразие вариантов ВГВ среди пациентов Сибирского региона аналогично разнообразию, наблюдаемому в общей популяции. Широкая распространенность мутаций иммунного ускользания и лекарственной устойчивости, способных приводить к ложноотрицательным результатам ИФА-скрининга на HBsAg, безуспешной профилактике и вирусологической неэффективности терапии ВГВ-инфекции, представляет собой серьезную проблему. Актуализация данных по генотипическому разнообразию ВГВ позволяет отслеживать пути передачи, появление и распространение новых вариантов вирусов, в том числе с мутациями лекарственной устойчивости или «иммунологического ускользания».

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-185

СИНТЕЗ ТИОСЕМИКАРБОЗОНОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ SARS-COV-2 И ВИРУСОВ ГРИППА H1N1

SYNTHESIS OF THIOSEMICARBOSONES WITH ACTIVITY AGAINST SARS-COV-2 AND H1N1 INFLUENZA VIRUSES

О. А. Жупикова[1], О. И. Яровая[1], М. К. Маренина[1], Ю. В. Мешкова[1], С. В. Беленькая[1,2], Д. Н. Щербаков[1,2], А. В. Зайковская[2], О. В. Пьянков[2], М. Г. Михальский[3], В. В. Зарубаев[3], В. И. Поткин[4], И. А. Колесник[4], А. В. Иванов[5], Н. Ф. Салахутдинов[1], М. В. Хвостов[1]

[1]*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*
[2]*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[3]*Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера*
[4]*Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск*
[5]*Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН*

O. A. Zhupikova[1], O. I. Yarovaya[1], M. K. Marenina[1], Y. V. Meshkova[1], S. V. Belenkaya[1,2], D. N. Shcherbakov[1,2], A. V. Zaykovskaya[2], O. V. Pyankov[2], M. G. Mikhalsky[3], V. V. Zarubaev[3], V. I. Potkin[4], I. A. Kolesnik[4], A. V. Ivanov[5], N. F. Salakhutdinov[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]*Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg*
[4]*Institute of Physical Organic Chemistry NAS of Belarus, Minsk*
[5]*Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS*

✉ o.zhupikova@yandex.ru

Аннотация

В работе был осуществлен синтез новых тиосемикарбазонов на основе соответствующих гетероциклических альдегидов и изучены их противовирусные свойства. Вещества были получены с выходами от 82 до 94 %. Показано, что 2-((5-(р-толил)изоксазол-3-ил)метилен)гидразин-1-карботиамид проявляет активность в отношении вируса SARS-CoV-2 и вирусов гриппа H1N1 в микромолярном диапазоне и не является токсичным на исследуемых клеточных линиях.

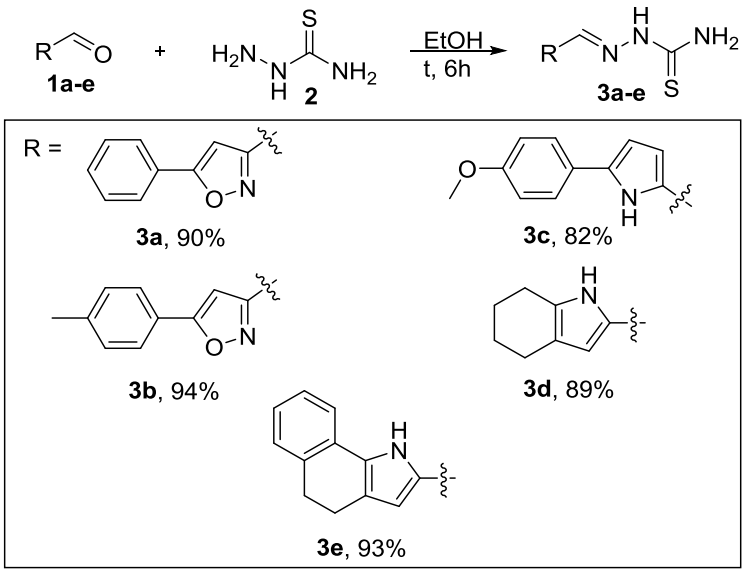
Abstract

In this work, new thiosemicarbazones were synthesized based on the corresponding heterocyclic aldehydes and their antiviral properties were studied. The substances were obtained as colored solids in yields ranging from 82 to 94 %. It has been shown that 2-((5-(p-tolyl)isoxazol-3-yl)methylene)hydrazine-1-carbothiamide exhibits activity against SARS-CoV-2 and H1N1 influenza viruses in the micromolar range and is not toxic on the tested cell lines.

Поиск новых агентов, обладающих активностью в отношении широкого спектра вирусов — важная задача органической и медицинской химии [1, 2]. Тиосемикарбазоны, в свою очередь, известны своими противовирусными свойствами [3]. С целью поиска новых соединений, проявляющих активность в отношении вирусов разных типов, нами были получены новые соединения **3a-e** на основе соответствующих альдегидов **1a-e** и тиосемикарбазида **2** (см. рисунок). Синтез исходных альдегидов был описан ранее [4, 5].

В первую очередь была проверена возможность ингибирования основной вирусной протеазы 3Clpro вируса SARS-CoV-2 полученными соединениями **3a-e** с использованием разработанной нами суррогатной тест-системы с рекомбинантным вирусным белком [6]. В качестве препаратов сравнения использовались известные ингибиторы 3Clpro (дисульфирам, Эбселен, GC376, Нирматрелвир). Тиосемикарбазоны проявляли активность в отношении вирусной протеазы, хоть и ниже, чем у препаратов сравнения, при этом наибольшую активность наблюдали у соединения **3d** (IC_{50} = 6,90 ± 4,25).

© О. А. Жупикова, О. И. Яровая, М. К. Маренина, Ю. В. Мешкова, С. В. Беленькая, Д. Н. Щербаков, А. В. Зайковская, О. В. Пьянков, М. Г. Михальский, В. В. Зарубаев, В. И. Поткин, И. А. Колесник, А. В. Иванов, Н. Ф. Салахутдинов, М. В. Хвостов, 2024



Синтез тиосемикарбазонов из соответствующих альдегидов

Активность в отношении вируса была проверена с помощью цитопатической тест-системы с использованием инфекционного вируса SARS-CoV-2 штамм Wuhan lineages Ba на клеточной линии Vero. В качестве препарата сравнения использовался ремдесивир. Полученные соединения **3a**, **3b** и **3d** не оказывали цитотоксического действия по отношению к исследуемой клеточной линии, в отличие от **3c** и **3e**. Наибольшая активность была выявлена у тиосемикарбазонов **3b** и **3e** (IC_{50} = 12,4 ± 0,9 и IC_{50} = 12,1 ± 2,1 соответственно), в то же время у соединения **3b** наблюдался наибольший индекс селективности.

Чтобы проверить возможность полученных соединений выступать в роли ингибитора вирусов гриппа H1N1, было проведено тестирование тиосемикарбазонов с использованием штамма вируса гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) на клеточной линии MDCK. В качестве препарата сравнения был использован римантадин. Токсичного действия в отношении используемой клеточной линии не было выявлено для соединений **3b**, **3d** и **3e**, вещества **3a** и **3c**, напротив, относительно токсичны. Тиосемикарбазоны **3b** и **3c** проявили наибольшую активность (IC_{50} = 7,5 ± 0,9 и IC_{50} = 3,6 ± 0,5 соответственно).

Полученный тиосемикарбазаон **3b** заслуживает особого внимания, так как он не только не проявил токсических свойств в отношении обеих клеточных линий, но продемонстрировал ингибирующие свойства в отношении вирусов SARS-CoV-2 и гриппа H1N1.

Литература

1. Pelipko V. V., Litvinov I. A., Sinegubova E. O. et al. 2-[2-(Phenylcarbamoyl) hydrazinylidene] propanoates: synthesis, structure and in vitro study of the activity against influenza virus // Mendeleev Commun. 2024. Vol. 34 (2). P. 259–261.

2. Novikov M. S., Paramonova M. P., Kirillov I. M. et al. New N^1-(4-aryloxybenzyl) uracils containing N^3-positioned 4-(trimethyleneoxy) benzoic acid moiety, and study of their antiviral activity against SARS-CoV-2 and influenza virus // Mendeleev Commun. 2023. Vol. 33 (4). P. 537–538.

3. Moharana A. K., Dash R. N., Subudhi B. B. Thiosemicarbazides: updates on antivirals strategy // Mini-Rev. Med. Chem. 2020. Vol. 20 (20). P. 2135–2152.

4. Kolesnik I. A., Petkevich S. K., Mertsalov D. F. et al. Synthesis of 5-arylisoxazole and 4,5-dichloroisothiazole amino-substituted derivatives and their biological activity // Russ. J. Gen. Chem. 2022. Vol. 92 (1). P. 29–39.

5. Mikhaleva A. I., Zaitsev A. B., Ivanov A. V. et al. Expedient synthesis of 1-vinylpyrrole-2-carbaldehydes // Tetrahedron Lett. 2006. Vol. 47 (22). P. 3693–3696.

6. Belenkaya S. V., Merkuleva I. A., Yarovaya O. I. et al. The main protease 3CLpro of the SARS-CoV-2 virus: how to turn an enemy into a helper // Front. Bioeng. Biotechnol. 2023. Vol. 11. P. 1187761.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-186

ТРЕХМЕРНЫЕ МОДЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА

THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURE MODELS FOR STUDYING HUMAN VIRUSES

И. А. Иващенко, О. С. Федотова, И. А. Короткова, А. Е. Панова, В. В. Василевский, А. В. Остапчук

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

I. A. Ivashchenko, O. S. Fedotova, I. A. Korotkova, A. E. Panova, V. V. Vasilevsky, A. V. Ostapchuk

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

✉ ivashenko_ia@niivirom.ru

Аннотация

Традиционные двумерные клеточные культуры недостаточно эффективны для моделирования сложных взаимодействий вирусов с клетками хозяина, что может снижать точность предсказаний патогенеза и оценки эффективности противовирусных препаратов. Использование 3D-модели клеток для культивирования вирусов предлагает новые перспективы для более точного и эффективного исследования вирусных инфекций.

Abstract

Traditional two-dimensional cell cultures are not sufficiently effective for modeling complex interactions between viruses and host cells, which can reduce the accuracy of predictions regarding pathogenesis and the evaluation of antiviral drug efficacy. The use of 3D cell models for virus cultivation offers new prospects for more precise and effective study of viral infections.

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, к 2016 г. около 3,7 млрд человек в возрасте до 50 лет, что составляет 67 % населения, были инфицированы вирусом простого герпеса человека Herpes simplex virus-1 (HSV-1), относящимся к респираторной группе вирусных инфекций. В связи с этим актуальны разработка улучшенных методов терапии и профилактики герпесвирусной инфекции, а также создание эффективной вакцины. Несмотря на широкий диапазон клеток-хозяев, позволяющий моделировать различные аспекты инфекции, традиционные 2D-клеточные культуры имеют ограниченные возможности в точном воспроизведении взаимодействий вирусов с тканями и органами хозяина, что снижает корректность результатов исследований и их применимость к клиническим ситуациям [1]. При этом чрезмерное применение экспериментальных животных моделей значительно повышает стоимость исследований, обостряет вопросы этичности и правомерности их проведения [2]. Современные методы культивирования клеток предлагают разнообразные подходы к имитации физиологических процессов и изучению патологий *in vitro*. Среди них особое внимание привлекают трехмерные (3D) клеточные культуры, такие как сфероиды, которые способны более точно воспроизводить микроокружение клеток в организме по сравнению с двухмерными (2D) культурами [3]. Это способствует получению более достоверных результатов исследований *in vitro* и их эффективному переносу на модели *in vivo*, что особенно актуально в контексте проведения дорогостоящих и трудоемких фаз клинических испытаний при производстве лекарственных средств [2, 4].

Таким образом, цель настоящего исследования — апробация способа культивирования вируса простого герпеса в трехмерных сфероидах, сформированных из клеток легких эмбрионов человека (ЛЭЧ-3), с использованием агарозного гидрогеля.

Для формирования микролунок в гидрогеле агарозы применили силиконовую матрицу. В эксперименте использовали диплоидную клеточную культуру ЛЭЧ-3 на 10 пассаже. Для формирования сфероидов наносили суспензию клеток на массив микролунок, в концентрации 3000 клеток на микролунку. Культивирование сфероидов проводили в 6-луночном планшете (SPL Life Sciences, Корея) в условиях термостата при 37 °С во влажной атмосфере с 5%-м содержанием CO_2. Смену питательной среды проводили раз в двое суток.

В результате роста ЛЭЧ-3 в течение 48 ч в микролунках агарозного геля образовались трехмерные клеточные агрегаты. При визуальной оценке структуры установлено, что сфероиды состоят из фибробластов и имеют стабильную компактную структуру. Дальнейший эксперимент заключался в анализе культивирования вируса ВПГ-1/L2 в сфероидах ЛЭЧ-3. Исходная инфекционная активность штамма вируса составляла 10^5TCID50/мл.

© И. А. Иващенко, О. С. Федотова, И. А. Короткова, А. Е. Панова, В. В. Василевский, А. В. Остапчук, 2024

Опытные сфероиды однократно отмывали средой DMEM от среды роста, далее вносили по 200 мкл образцов вируссодержащей жидкости в концентрации 10^3TCID50/мл и добавляли поддерживающую среду DMEM в количестве 1,8 мл. В контрольные лунки со сфероидами после отмывки от среды роста добавляли 2,0 мл поддерживающей среды без вируса. Инкубацию проводили в стандартных условиях в течение 5 суток. Для оценки цитопатического эффекта (ЦПЭ) инфицированные сфероиды наблюдались ежедневно с 1-го по 5-й день инкубации с использованием инвертированного микроскопа (Zeiss Axio Vert.A1, Carl Zeiss, Германия). Степень ЦПЭ оценивали по морфологическим изменениям клеток ЛЭЧ и степени разрушения сфероидов. В опытных образцах на 4-й день культивирования выявлено цитопатическое действие вируса, сфероиды утратили плотность структуры, в то время как в контрольных образцах оставались без изменений.

Для установления активности репродукции вируса в сфероидах использовали методику титрования вируса. В 48-луночный планшет с плотным монослоем клеточной культуры ЛЭЧ-3 внесли десятикратные (с 10^{-1} до 10^{-8}) разведения ВСЖ, взятой из сфероидов на 5-е сутки эксперимента. Планшет инкубировали в стандартных условиях в течение 5 суток с ежедневной визуальной оценкой наличия характерного для ВПГ-1 ЦПЭ. Первые признаки цитопатогенного действия были отмечены на третьи сутки, на 5-й день инфекционный титр ВПГ-1 составил 4 lgTCID50/ml по методу Рида — Менча. Эксперимент свидетельствует о жизнеспособности вируса в сфероидах ЛЭЧ.

Таким образом, результаты экспериментов показали, что сфероиды ЛЭЧ-3 могут поддерживать репликацию вируса простого герпеса, что делает их перспективной моделью для изучения вирусного патогенеза и тестирования новых терапевтических и профилактических средств против данного агента.

Литература

1. De Dios-Figueroa G.T., Aguilera-Marquez J.D.R., Camacho-Villegas T.A., Lugo-Fabres P.H. 3D Cell Culture Models in COVID-19 Times: A Review of 3D Technologies to Understand and Accelerate Therapeutic Drug Discovery // Biomedicines. 2021. Vol. 9, No. 6. P. 602.

2. Kiani A.K., Pheby D., Henehan G. et al. Ethical considerations regarding animal experimentation // J. Preventive Med. and Hygiene. 2022. Vol. 63, No. 2S3. P. E255.

3. Kim W., Gwon Y., Park S. et al. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration // Bioactive Materials. 2023. Vol. 19. P. 50–74.

4. Zanoni M., Cortesi M., Zamagni A. et al. Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids // J. Hematology Oncology. 2020. Vol. 13, No. 1. P. 97.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-187

ПОСЛЕДНИЕ ДАННЫЕ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ВИРУСОВ ПЧЕЛ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК*

THE LAST DATA ABOUT CULTIVATION OF BEE VIRUSES IN THE CELL CULTURES

А. Г. Калинин

Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН, Москва

A. G. Kalinin

Federal Research Center — All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Y. R. Kovalenko RAS, Moscow

✉ kalinin.andrew2010@yandex.ru

Аннотация

В статье описываются возможности культивирования различных вирусов пчел. Показаны культуры клеток, в которых данные инфекционные агенты могут реплицироваться.

Abstract

The article describes the possibilities of cultivating various bee viruses. Cell cultures in which these infectious agents can be replicated are shown.

Введение

В настоящее время пчелы остались наиболее значимыми животными, поскольку они выполняют роль опылителей сельскохозяйственных культур, что превосходит производство продукций пчеловодства. Считается, из 115 основных культур, выращиваемых в мире, 87 зависят от них, в том числе 13 — полностью, 30 — в значительной и 27 — в умеренной степени. Урожай подсолнечника, моркови, яблони и многих других зависит от опылителей, среди которых пчелы играют важное значение в этом вопросе [1–3].

Пчелы, как и другие сельскохозяйственные животные, чувствительны к различным возбудителям инфекционных, в том числе вирусных заболеваний. Известно более 20 вирусов — возбудителей заболеваний пчел [4]. Одной из наиболее значительных вирусных инфекций пчел в РФ остается мешотчатый расплод. Из инфекционных агентов, наносящих значительный урон пчеловодству, также остаются такие, как вирус паралича пчел, вирус деформации крыла, вирус черных маточников и другие возбудители вирусных заболеваний пчел [5–7].

В настоящее время были проведены эксперименты по изучению чувствительности культур клеток различных животных к вирусам пчел [8, 9]. Однако мало информации по изучению их размножения в культурах клеток иного видового и тканевого происхождения.

Культуры клеток животных являются неотъемлемой частью биотехнологии. Они применяются для изучения вопросов общей биологии, цитологии, генетики, вирусологии, иммунологии и инфекционной патологии [10, 11].

Культивирование *in vitro* ВМР

В последние годы ученых интересует вопрос репликации ВМР в культурах клеток. Исследователи предлагают различные способы культивирования вирусов пчел. Согласно их данным, вирус проявляет инфекционные свойства в определенных культурах клеток [9, 12].

Первая группа ученых придерживалась мнения, что ВМР лучше всего реплицируется в культурах клеток от медоносных пчел [13, 14].

Другие авторы указывали, что культивирование ВМР возможно в гетерологичных культурах клеток. Вирус реплицируется в культурах клеток куриных и мышиных фибробластов. Также возможно проявление вируса в виде ЦПД в последующих пассажах инфицированных клеток [13]. Г. А. Кононов считает, что ВМР не способен к подобному пассированию [15].

Также для культивирования ВМР использовались перевиваемые культуры клеток. Так, присутствие вируса в культуре клеток Vero регистрировалось методом гнездовой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией до 9 пассажа без проявления ЦПД [7].

* Исследование выполнено в соответствии с утвержденным планом НИР ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН за 2022–2026 гг. в рамках госзадания (FGUG-2022-0010).

© А. Г. Калинин, 2024

Известно, что ВМР можно реплицировать в культуре клеток свиного происхождения. Культуры клеток РК-15, IBRS-2, РК-С4 оказались способными к пассированию вируса [7, 16].

При проведении эксперимента по выявлению способностей культур клеток к репликации в них ВМР было показано, что клетки HeLa, НЕР-2, СОЦ, Детройт-6, ВНК-21 [17], Sf9 [7] не способны к пассированию вируса.

Культивирование *in vitro* других вирусов пчел

Также для культивирования применялись другие вирусы пчел. Для проведения подобных экспериментов применялись различные клеточные модели. Например, первые эксперименты по пассированию вируса паралича пчел проходили в эксплантатах яичников маток пчел и первично-трипсинизированной культуре клеток яиц пчелы [9, 18, 19].

Также эксперименты по пассированию вируса паралича пчел проходили в культуре клеток Sf9 и культуре клеток HeLa. Обе культуры не проявляли признаков ЦПД [14, 20].

Также была показана возможность культивирования ВДК в различных культурах клеток. Было выявлено, что вирус реплицируется в культурах клеток IRE/CTVM19 — культуре клеток иксодовых клещей, культуре клеток куколок рабочих пчел, P1 — культуре клеток гемоцитов ночной моли без проявления ЦПД [21–23].

Таким образом, для репликации вышеперечисленных вирусов в основном применялись первичные культуры клеток медоносной пчелы или культуры клеток насекомых. Для ВМР также применялись первичные культуры клеток гетерологичного типа, такая как ПО. Мало данных по размножению вирусов в перевиваемых культурах клеток, что требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Конусова О. Л., Островерхова Н. В., Погорелов Ю. Л. Пчеловодство Томской области. Прошлое и настоящее // Пчеловодство. 2010. № 4. С. 60–61.

2. Скребнева, Л.А., Билалов Ф. С., Латыпова В. З., Шлычков А. П. Использование медоносных пчел для биоиндикации уровня загрязнения атмосферного воздуха тяжелыми металлами // Вестн. технол. ун-та. 2015. Т. 18, № 17. С. 248–252.

3. Oldroyd B. P., Nanork P. Conservation of Asian honey bees // Apidologie. 2009. Vol. 40. P. 296–312.

4. Allen M., Ball B. V. The incidence and world distribution of the honey bee viruses // Bee World. 1996. Vol. 77. P. 141–162.

5. Сотников А. Н., Королев А. В. Мешотчатый расплод — угроза пчеловодству // Пчеловодство. 2014. № 5. С. 30–32.

6. Шишкина В. В., Пашаян С. А., Калашникова М. В. Эпизоотологическое состояние пасек юга Тюменской области // Пчеловодство. 2014. № 7. С. 38–39.

7. Kweon C., Yoo M., Noh J. et al. Derivation of cell-adapted Sacbrood virus (SBV) from the native Korean honeybee // Virus Res. 2015. Vol. 198. P. 15–21.

8. Гробов О. Ф., Смирнов А. М., Попов Е. Т. Болезни и вредители медоносных пчел: справ. М.: Агропромиздат, 1987. С. 3, 5–8.

9. Carrillo-Tripp J., Dolezal A. G., Goblirsch M. J. et al. In vivo and in vitro infection dynamics of honey bee viruses // Sci. Rep. 2016. Vol. 6. P. 1–12.

10. Гальнбек Т. В., Шуляк А. Ф., Акиншина Г. Т. и др. Влияние азотнокислого лантана на клетки легкого плода крс «ЛПК» *in vitro* // Ветеринария и кормление. 2014. № 5. С. 68–69.

11. Taranov D., Yershebulov Z., Amanova Z. et al. Study of Cultural Characteristics and Interference of Peste Des Petites Ruminants Virus and Sheep Pox Virus in Co-Culture // Life Sci. J. 2014. Vol. 11 (9). P. 227–231.

12. Kalinin A. G., Kuleshov K. V., Isaev Y. G. Study of cell culture strains sensitivity to sacbrood virus // IOP Conf. Ser: Earth Environ. Sci. 2021. Vol. 677 (4). 042031. P. 1.

13. Алексеенко Ф. М., Ревенок В. А., Чепурко М. А. Справочник по болезням и вредителям пчел / 2-е изд., перераб. и доп. Киев: Урожай, 1991. С. 83–87, 116.

14. McMenamin A. J., Parekh F., Lawrence V., Flenniken M. L. Investigating Virus–Host Interactions in Cultured Primary Honey Bee Cells // Insects. 2021. Vol. 12 (7). P. 1–30.

15. Кононов Г. А. Справочник по ветеринарии. Л.: Колос, 1978. 328 с.

16. Tae K. G., Sung K. Y., Jin K. H. Cell line derived from porcine kidney for mass production of Sacbrood virus and uses there of // KR101996736B1. 2019.

17. Керимбаев А. К. Изучение некоторых биологических свойств вируса мешотчатого расплода у личинок медоносной пчелы и усовершенствование методов лабораторной диагностики заболевания: дис. … канд. биол. наук. М., 1972. С. 29–30, 41–45, 47–48, 70–74.

18. Зюман Б. В. Факторы и механизмы неспецифической резистентности медоносной пчелы (Apis mellifera L.): дис. … д-ра ветеринар. наук. Благовещенск, 1990. С. 75.

19. Giauffret A., Quiot I. M., Routiers P., Vago C. Culture in vitro de cellules de l·Abeille // C. R. Acad. Sci. P., 1967. № 265. P. 11, 800–803.

20. Ren J., Cone A., Willmot R., Jones I. M. Assembly of Recombinant Israeli Acute Paralysis Virus Capsids // PLOS ONE. 2014. Vol. 9, is. 8. P. 1.

21. Bell-Sakyi L., Attoui H. Virus discovery using tick cell lines // Evolutionary Bioinformatics. 2016. Vol. 12 (S2). P. 31–34.

22. Erez T., Chejanovsky N. Infection of a Lepidopteran Cell Line with Deformed Wing Virus // Viruses. 2020. Vol. 12. P. 1–11.

23. Hunter W. B. Medium for development of bee cell cultures (Apis mellifera: Hymenoptera: Apidae) // In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal. 2010. No. 46. P. 83–86.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-188

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ И ТРАНСПОЗИЦИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННОГО ПОДХОДА TE-STORM *

ACTIVATION MOBILE ELEMENTS TRANSCRIPTION AND TRANSPOSITION USING NOVEL APPROACH OF VIRUS-INDUCED TE-STORM

Е. Д. Камараули[1,2], А. В. Власова[1,2], Д. В. Перевозчиков[2,3], И. В. Киров[1,2]

[1] *Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва*
[2] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[3] *Российский государственный аграрный университет — МСХА им. К. А. Тимирязева, Москва*

E. D. Kamarauli[1,2], A. V. Vlasova[1,2], D. V. Perevozchikov[2,3], I. V. Kirov[1,2]

[1] *All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[3] *Russian State Agrarian University — Moscow Timiryazev Agricultural Academy*

✉ kamarauli.ed@phystech.edu

Аннотация

В работе представлен новый метод TE-storm для активации мобильных элементов растений, основанный на транзиентном подавлении механизмов сайленсинга транспозонов с помощью рекомбинантных вирусов. Разработка TE-storm открывает новые возможности для внесения в геном мутаций с помощью естественных биологических мутагенов — мобильных элементов.

Abstract

In this work, we represent a new TE-storm method for activation plant mobile elements. Our approach is based on transient suppression of the transposon silencing mechanisms using recombinant viral constructs. The development of TE-storm opens new possibilities for introducing mutations into the genome using the natural biological mutagens — mobile elements.

Мобильные элементы составляют значительную часть геномов эукариот, особенно у растений. Например, у кукурузы они занимают около 85 % генома [1]. Кроме увеличения размера генома, мобильные элементы способны изменять экспрессию генов и влиять на генетическое и фенотипическое разнообразие, что значительно повлияло на эволюцию растений [2]. Более того, генетическое разнообразие, создаваемое мобильными элементами, играет ключевую роль в получении исходного материала для селекции растений.

Транспозиционная активность мобильных элементов в растениях подавляется на различных уровнях, при этом ключевым сдерживающим механизмом выступает РНК-зависимое метилирование ДНК (RdDM). Действие RdDM приводит к метилированию мобильных элементов посредством привлечения эпигенетических факторов с помощью малых РНК [3]. Благодаря механизмам метилирования ДНК частота активации мобильных элементов в естественных условиях чрезвычайно низка. Для повышения активности мобильных элементов используются разные стрессовые условия, специальные линии растений, мутантные по генам метилирования ДНК и химические соединения, способные блокировать работу систем сайленсинга транспозонов. Наиболее эффективным среди перечисленных подходов является использование растений, мутантных по генам, вовлеченным в регуляцию мобильных элементов, однако получение таких растений — это сложная и трудоемкая задача. Одним из методов транзиентного воздействия на гены является вирус-опосредованный сайленсинг генов (VIGS) [4]. Помимо гипометилирования для активации транскрипции многих мобильных элементов необходимы стрессовые условия, например повышение температуры. В работе был разработан новый подход, названный нами TE-storm, для активации мобильных элементов растений, основанный на комплексном воздействии на механизмы метилирования с помощью VIGS и теплового стресса. В качестве мишеней для сайленсинга с помощью VIGS были выбраны гены растения *Arabidopsis thaliana*, участвующие в RdDM: NRPE (Pol V), NRPD (Pol IV), RDR2, RDR6, DRM. С помощью TE-storm нам удалось активировать ретротранспозон ONSEN во всех вариантах растений, однако наиболее эффективной мишенью оказался ген NRPD, кодирующий большую субъединицу Pol IV.

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 22-64-00076).

© Е. Д. Камараули, А. В. Власова, Д. В. Перевозчиков, И. В. Киров, 2024

После успешной активации мобильных элементов с помощью метода TE-storm нами было проанализировано следующее поколение на наличие инсерций. Было найдено 4 растения из 15, в которых обнаружены новые инсерции мобильных элементов.

Таким образом, TE-storm является новым методом биологического мутагенеза для активации мобильных элементов растений и обеспечения наследования их инсерций.

Литература

1. Vicient C. M. Transcriptional activity of transposable elements in maize // BMC Genomics. 2010. Vol. 11, No. 1. P. 601.

2. Bennetzen J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution // Plant Mol. Evol. / ed. J. J. Doyle, B. S. Gaut. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. P. 251–269.

3. Ito H. et al. A Stress-Activated Transposon in Arabidopsis Induces Transgenerational Abscisic Acid Insensitivity // Sci. Rep. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, No. 1. P. 23181.

4. Burch-Smith T. M. et al. Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants // Plant J. Cell Mol. Biol. 2004. Vol. 39, No. 5. P. 734–746.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-189

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ФЛАВИПОДОБНЫХ ВИРУСОВ В ОБРАЗЦАХ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* И *IXODES PAVLOVSKYI*, СОБРАННЫХ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

DETECTION OF GENETIC MARKERS OF FLAVI-LIKE VIRUSES IN SAMPLES OF TICKS IXODES PERSULCATUS AND IXODES PAVLOVSKYI COLLECTED IN THE NOVOSIBIRSK REGION

К. В. Карелина, Р. Б. Баяндин, С. Е. Пашковский, В. А. Терновой

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

K. V. Karelina, R. B. Bayandin, S. E. Pashkovsky, V. A. Ternovoi

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ karelina_kv@vector.nsc.ru

Аннотация

Jingmenvirus (*JMV*) представляют собой группу флавиподобных одноцепочечных РНК-вирусов с положительным смыслом и сегментированным геномом (4 сегмента), относящихся к семейству *Flaviviridae*, переносчиками которых являются клещи. В последнее время появляются данные о выявлении новых флавиподобных вирусов, передающихся клещами, у пациентов с лихорадками.

Нами был проведен скрининг клещей, собранных в Новосибирской области, с целью выявления сегментированных флавиподобных вирусов на территории Новосибирской области. В исследование было взято 235 клещей вида *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovkyi* (47 пулов), методом ПЦР выявлено 7 положительных образцов на РНК *Jingmen tick virus*, уровень инфицированности составил 14,8 ± 2 %.

Abstract

Jingmenviruses (JMV) are a group of flavi-like single-stranded RNA viruses with positive sense and segmented genome (4 segments) belonging to the family Flaviviridae, which are transmitted by ticks. Recently, there are emerging data on the detection of novel tick-borne Flaviviridae-like viruses in febrile patients.

We screened ticks collected in the Novosibirsk region to detect segmented flavi-like viruses in the Novosibirsk region. 235 ticks of Ixodes persulcatus and Ixodes pavlovkyi species (47 pools) were taken into the study; PCR method revealed 7 positive samples for Jingmen tick virus RNA, the infection rate amounted to 14.8 ± 2 %.

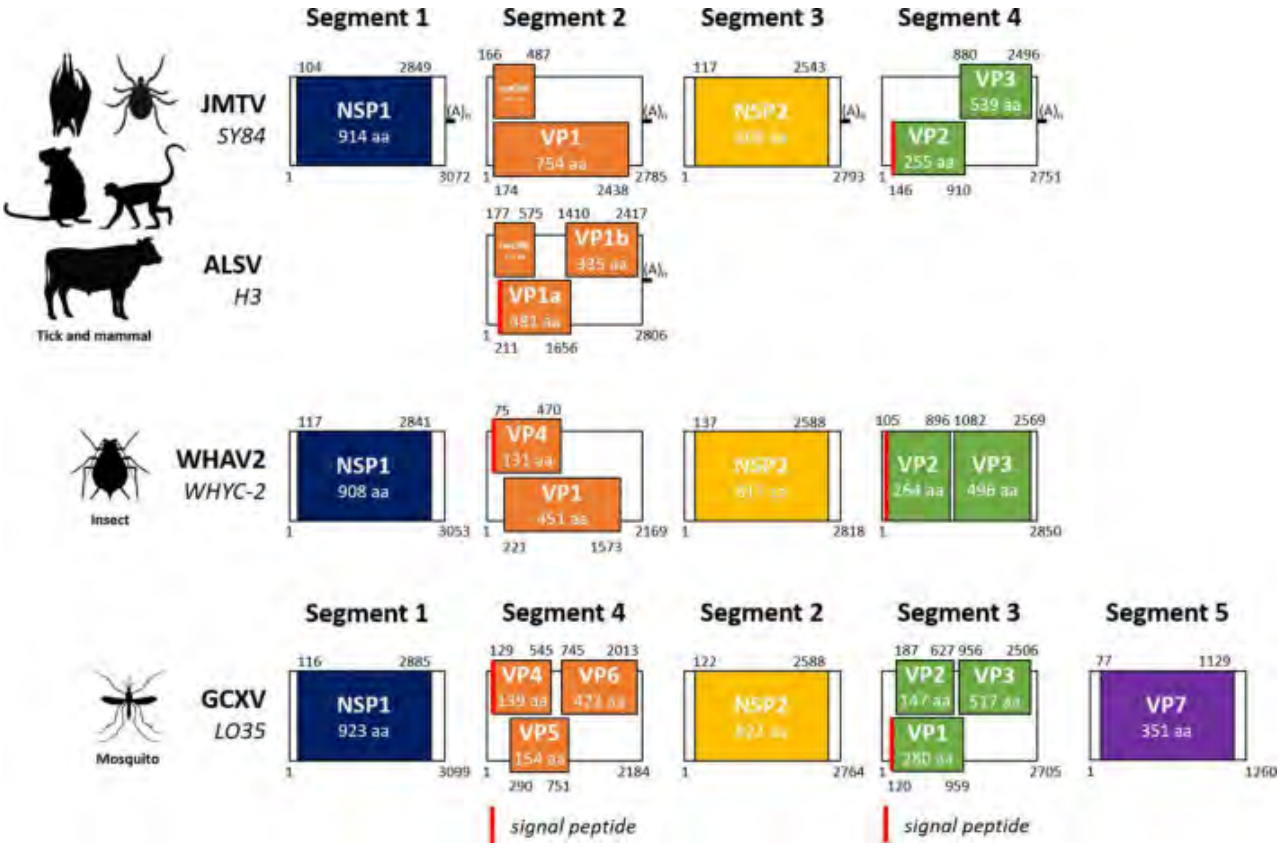
В последнее время обнаружено множество новых флавиподобных вирусов и, как недавно было показано, некоторые из них могут быть идентифицированы у людей с лихорадочными и гриппоподобными симптомами [1, 2]. Группа *Jingmenvirus* (JMV) занимает особое место среди флавивирусов, поскольку они имеют сегментированный одноцепочечный РНК-геном. В нее входят такие вирусы, как *Alongshan virus* (ALSV), *Takachi virus* (TAKV), *Jingmen tick virus* (JMTV) и др. *Jingmenvirus* — это группа вирусов, классифицированных Международным комитетом по таксономии вирусов как неклассифицированные *Flaviviridae* — флавиподобные вирусы [3] (см. рисунок).

Прототип вируса группы *Jingmen* (JMV) был обнаружен у клещей *Rhipicephalus microplus*, собранных в городе Цзинмэнь (провинция Хубей, Китай), в 2010 г. [3]. Геномы вирусов данной группы состоят из четырех-пяти сегментов, кодирующих до семи структурных белков и двух неструктурных белков. Неструктурные белки демонстрируют высокую гомологию с флавивирусными неструктурными белками (NS2B/NS3 и NS5) [4].

С момента открытия последовательности вирусов группы JMV были обнаружены в образцах членистоногих, происходящих из четырех континентов: Азии (Китай, Лаосская Народно-Демократическая Республика, Япония), Европы (Турция, Италия, Косово, Румыния, Россия), Америки (Бразилия, Тринидад и Тобаго, Французские Антильские острова, Колумбия) и Африки (Уганда, Гвинея, Кения). На сегодняшний день наиболее часто выявляют РНК вирусов группы JMV у клещей *R. microplus* [3].

Помимо членистоногих, РНК вирусов группы JMV была обнаружена у позвоночных: крупного рогатого скота, приматов, летучих мышей, грызунов, черепах [3]. Серологические и генетические маркеры флавиподобных вирусов были также обнаружены у пациентов с лихорадочными и гриппоподобными симптомами в Китае и Сербии [1, 2].

© К. В. Карелина, Р. Б. Баяндин, С. Е. Пашковский, В. А. Терновой, 2024



Сравнение сегментированных геномов некоторых флавиподобных вирусов [3]

Несмотря на появление большого количества новых данных о флавиподобных вирусах, требуются дальнейшие исследования многих аспектов, таких как тропизм вирусов, цикл передачи, структура и механизмы репликации и рестрикции, а также эпидемиология. Необходим постоянный мониторинг циркуляции и генетических изменений для выявления вариантов, способных преодолевать видовой барьер и обладающих эпидемическим потенциалом.

Материалы и методы

Для исследования были взяты 235 клещей вида *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi*, собранных на флаг в городских и пригородных биотопах Новосибирска и Новосибирской области. Выделение нуклеиновых кислот проводили методом фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора «Литех» (Москва) согласно инструкции производителя. Клещи объединялись в пулы по 5 штук. Всего 47 пулов. Тестирование исследуемых образцов проводилось с помощью ОТ-ПЦР с праймерами для выявления фрагмента РНК 4-го сегмента (длиной около 400 п.о) вирусов группы *Jingmen* (JMV). Секвенирование фрагментов нуклеиновых кислот проводили методом Сэнгера с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Полученные последовательности анализировали с помощью программ BLAST и Mega X.

Результаты

На наличие генетического материала флавиподобных вирусов были исследованы 47 пулов клещей видов *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi*, отловленных в весенне-летний сезон 2023 г. в Новосибирске и Новосибирской области.

Методом ПЦР было выявлено 7 положительных образцов, уровень инфицированности составил 14,8 ± 2 %. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей Blast показал, что выявленные вирусы относятся к *Jingmen tick virus* (JMTV) с уровнем гомологии 95,3 % (сравнение по 4-му сегменту). Наибольший уровень гомологии был с последовательностями из Китая.

Положительные пулы были секвенированы для идентификации вида клещей двумя парами праймеров по митохондриальной 16S рРНК и гену цитохромоксидазы. Количество пулов клещей вида *Ixodes persulcatus* составило 4 (57,1 %) и *Ixodes pavlovskyi* — 3 (42,9 %).

Полученные данные подтверждают активную циркуляцию флавиподобных вирусов на территории Новосибирска и Новосибирской области.

Заключение

Таким образом, впервые клещи Новосибирской области видов *Ixodes persulcatus* и *Ixodes pavlovskyi* были протестированы на наличие флавиподобных сегментированных вирусов. Полученные результаты требуют проведения дополнительных исследований как в отношении диапазона хозяев сегментированных флавиподобных вирусов и точной идентификации вирусов, так и их патогенетических свойств для людей и животных.

Литература

1. Jia N., Liu H. B., Ni X. B. et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study // EbioMedicine. 2019. Vol. 43. P. 317–324.

2. Temmam S., Bigot T., Chrétien D. et al. Insights into the Host Range, Genetic Diversity, and Geographical Distributionof Jingmenviruses // mSphere. 2019. Vol. 4. P. e645–e619.

3. Qin X. C., Shi M., Tian J. H. et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors // Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. 2014. Vol. 111. Vol. 6744–6749.

4. Colmant A. M.G., Charrel R. N., Coutard B. Jingmenviruses: Ubiquitous, understudied, segmented flavi-like viruses // Front Microbiol. 2022 Oct 10. Vol. 13. 997058.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-190

АНАЛИЗ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВАКЦИНАЦИЕЙ ОТ ПОЛИОМИЕЛИТА, К ПОЛИОВИРУСАМ ВАКЦИННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ТИПА 2

ANALYSIS OF NEUTRALIZING ACTIVITY OF POLIOVACCINE-INDUCED ANTIBODIES TO VACCINE-DERIVED POLIOVIRUSES TYPE 2

Е. В. Карпова[1], Е. В. Яковчук[1], Л. И. Козловская[1,2]

[1]Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва
[2]Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва

E. V. Karpova[1], E. V. Yakovchuk[1], L. I. Kozlovskaya[1,2]

[1]Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow
[2]Sechenov First Moscow State Medical University

✉ evg_karpova@mail.ru

Аннотация

Выделены и отсеквенированы 4 изолята полиовируса вакцинного происхождения типа 2. Поставлена реакция нейтрализации изолятов сыворотками крови детей, привитых разными вакцинами. Проведен анализ спектров вируснейтрализующих антител.

Abstract

Four vaccine-derived polioviruses type 2 (VDPV2) were isolated and sequenced. A neutralization test of isolates with blood serum of children vaccinated with different vaccines was performed. An analysis of virus-neutralizing antibody spectra was conducted.

Полиомиелит возникает в результате инфицирования полиовирусом, пикорнавирусом вида *Enterovirus coxsackiepol*. В настоящее время это заболевание практически искоренено благодаря усилиям Глобальной инициативы по искоренению полиомиелита. Согласно данным, с 1988 г. удалось в 100 000 раз снизить число случаев заболевания полиомиелитом, а также искоренить дикие полиовирусы типов 2 и 3. Инициатива опирается на два основных направления: высокий охват вакцинацией как единственный эффективный способ защиты от полиомиелита и надзор за полиомиелитом. В настоящее время для рутинной иммунизации в мире используются две вакцины: инактивированная вакцина (ИПВ) и живая оральная вакцина (ОПВ) [1]. В отличие от инактивированной полиомиелитной вакцины (ИПВ), оральная полиовакцина (ОПВ) вызывает сильный кишечный иммунитет, который блокирует передачу полиовируса при последующих инфекциях. Однако аттенуированные штаммы ОПВ реплицируются в кишечнике и выделяются с фекалиями, но при снижении иммунной прослойки ввиду разных причин возможна циркуляция этих вирусов в популяции, что приводит к появлению полиовирусов вакцинного происхождения (ПВВП) и возникновению вспышек полиомиелита. В связи с особенностями полиовирусов типа 2 наибольшее количество вспышек и случаев полиомиелита в мире в последние 10 лет ассоциированы именно с ПВВП2. В 2016 г. компонент типа 2 был изъят из трехвалентной ОПВ с совершением глобального перехода на бивалетную бОПВ типов 1 и 3. При этом иммунитет к полиовирусам типа 2 поддерживается за счет введения 1–2 доз ИПВ в рамках рутинной иммунизации. Цель исследования — оценка нейтрализующей активности антител, индуцированных вакцинацией от полиомиелита по различным схемам, к полиовирусам вакцинного происхождения типа 2, выделенных в последние годы.

Изоляты ПВВП2 выделяли в культуре клеток в рамках Национальной программы по надзору за полиомиелитом в РФ. Нуклеотидные последовательности геномов определяли с помощью секвенирования по Сэнгеру. Титры нейтрализующих антител определяли методом реакции нейтрализации в культуре клеток Hep2c с сыворотками детей до 15 лет, вакцинированных по различным схемам (тОПВ, 1–3 дозы ИПВ).

В результате работы из проб сточной воды были выделены 3 изолята ПВВП2: в Москве в 2015 г. (53344), Республике Дагестан (76174) и Тверской области (74176) в 2023 г., а также 1 изолят был выделен в Воронеже

© Е. В. Карпова, Е. В. Яковчук, Л. И. Козловская, 2024

в 2021 г. (67270) из проб фекалий ребенка, прибывшего из Таджикистана. Секвенирование геномов штаммов выявило, что в среднем уровень дивергенции от вакцинного штамма Сэбин 2 составил от 4 до 17 %. Анализ нейтрализующей активности антител к этим изолятам проводили в сравнении с диким штаммом MEF и вакцинным штаммом Сэбин 2.

7–52 % сывороток детей, не полностью привитых (1–2 дозы ИПВ) от полиомиелита, не содержали нейтрализующих антитела к хотя бы одному ПВВП2. Сыворотки детей, полностью вакцинированных ИПВ (3 дозы), полностью нейтрализовали все 4 ПВВП2. Однако 4 % сывороток детей, полностью привитых тОПВ, не нейтрализовали наиболее измененный вариант 53344.

Таким образом, в общем применявшиеся и применяемые в настоящее время в РФ схемы вакцинации от полиомиелита формируют антитела, нейтрализующие даже сильно измененные ПВВП2.

Литература

1. Bandyopadhyay A. S. et al. Polio vaccination: past, present and future // Future Microbiol. 2015. Vol. 10. P. 791–808.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-191

РАЗРАБОТКА ВОСПРОИЗВОДИМОЙ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРИМОГО БЕЛКА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

DEVELOPMENT OF A REPRODUCIBLE SYSTEM FOR OBTAINING SOLUBLE PROTEIN E OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

А. А. Красильникова[1,2], М. С. Додина[1], Л. И. Козловская[1,2]

[1] *Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва*
[2] *Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

A. A. Krasilnikova[1,2], M. S. Dodina[1], L. I. Kozlovskaya[1,2]

[1] *Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*
[2] *Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ kras2048@gmail.com

Аннотация

Был получен белок Е оболочки вируса клещевого энцефалита методом коэкспрессии с шаперонами в клетках *E. coli* в агрегированной и частично растворимой формах. Были подобраны условия очистки белка для увеличения его количества. По результатам ИФА белок взаимодействовал с антителами, следовательно, он находился в нативной конформации.

Abstract

Envelope protein E of tick-borne encephalitis virus was obtained by coexpression with chaperones in *E. coli* in an aggregated and partially soluble forms. Conditions were optimized for protein purification in order to increase protein yield. According to ELISA's results, protein interacted with antibodies, hence it was in its native conformation.

Клещевой энцефалит (КЭ) является наиболее распространенным вирусным заболеванием, передаваемым клещами, в Европе и Азии. Из-за изменения климата область распространения клещей, переносящих вирус клещевого энцефалита (*Orthoflavivirus encephalitidis*, ВКЭ), расширяется. В последние годы количество случаев заболевания клещевым энцефалитом в неэндемичных регионах увеличилось [1].

В мире отсутствуют одобренные препараты для лечения КЭ [2], поэтому поиск противовирусных соединений становится особенно важным. Одной из перспективных мишеней противовирусных препаратов является белок Е ВКЭ, который играет ключевую роль во взаимодействии вируса с поверхностными рецепторами клеток. Получение рекомбинантного белка Е в растворимой форме затруднено из-за его склонности к деградации и агрегации при экспрессии. Поэтому целью данного исследования является получение растворимого белка sE (домены DI-DIII белка Е), а также подбор наиболее оптимальных условий, при которых выход белка будет наибольшим.

Плазмидную конструкцию, кодирующую белок, получали методом молекулярного клонирования. Далее плазмиду трансформировали в клетки *E. coli* штамм BL21(DE3), в которых проводили экспрессию.

При экспрессии белок подвергался протеазной деградации до коротких пептидов вследствие его неправильного фолдинга, что подтверждалось отсутствием сигналов на ожидаемой массе белка 47 кДа при вестерн-блот-анализе образцов клеточного осадка и супернатанта. Для преодоления проблемы мисфолдинга была проведена коэкспрессия белка с шаперонами. Экспрессию шаперонов осуществляли при помощи коммерческого набора Chaperone Plasmid Set (Takara Bio), содержавшего несколько плазмид, кодирующих разные группы шаперонов (dnaK-dnaJ-grpE, groES-groEL, groES-groEL-tig, tig). Вестерн-блот-анализ фракций клеточного осадка и супернатанта, полученных после коэкспрессии белка с каждой системой шаперонов, продемонстрировал, что только коэкспрессия с шаперонами dnaK-dnaJ-grpE и groES-groEL способствовала не только успешной экспрессии белка, но также его частичному переходу в растворимую форму из-за наличия сигнала, соответствующего массе белка, не только в клеточном осадке (агрегированный белок), но и в супернатанте.

Далее подбирали оптимальные условия коэкспрессии и очищали белок из супернатанта при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии. Хотя система коэкспрессии с шаперонами позволила получить белок sE сразу в растворимой форме, количество продукта после очистки было небольшим. Поэтому было решено

© А. А. Красильникова, М. С. Додина, Л. И. Козловская, 2024

выделить белок из телец включения, содержащихся в клеточном осадке, чтобы определить, какой метод обеспечивает наибольший выход белка в активной форме. Белок из телец включения получали двумя способами: солюбилизацией телец включения в 8М растворе мочевины с последующими рефолдингом методом диализа и хроматографической очисткой; солюбилизацией телец с последующими параллельными рефолдингом и очисткой на хроматографической колонке.

По количеству белка в зависимости от метода выделения (см. таблицу) был сделан вывод, что метод солюбилизации белка из телец включения с рефолдингом на колонке является наиболее предпочтительным для получения белка в необходимом количестве.

Количество белка на 1 л культуры в зависимости от метода выделения

Метод выделения	Из супернатанта	Из телец включения с рефолдингом на колонке	Из телец включения с диализом
Количество белка на 1 л культуры, мг	0,017	0,285	0,15

Оценку взаимодействия белка, полученного методом рефолдинга на колонке, с антителами проводили при помощи иммуноферментного анализа с использованием мышиных сывороток крови, содержащих антитела к клещевому энцефалиту. Для исследования белок брали в трех концентрациях: 10; 35 и 70 мкг/мл. По результатам значений оптической плотности в лунках при длине волны 450 нм был сделан вывод, что белок находится в своей нативной конформации и даже в минимальной концентрации (10 мкг/мл) успешно взаимодействует с антителами.

В результате исследования была создана воспроизводимая система получения белка Е вируса клещевого энцефалита в растворимой форме. В дальнейшем полученный белок будет использован для тестирования библиотек ингибиторов и биофизического анализа методами поверхностного плазмонного резонанса и кристаллографии.

Литература

1. Worku D.A. Tick-Borne Encephalitis (TBE): From Tick to Pathology // J. Clin. Med. 2023. Vol. 12 (21). P. 6859.

2. Ruzek D. et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines // Antiviral Res. 2019. Vol. 164. P. 23–51.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-192

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АМПЛИФИКАЦИИ SMART ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ РИНОВИРУСОВ

USING SMART AMPLIFICATION TECHNOLOGY TO OBTAIN WHOLE RHINOVIRUSES GENOMES

А. Д. Ксенафонтов[1], А. В. Фадеев[1], М. Коржанова[1],
С. А. Гешко[1], А. Б. Комиссаров[1], И. В. Киселёва[2], Д. А. Лиознов[1,3]

[1]НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург
[2]Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург
[3]Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

A. D. Ksenafontov[1], A. V. Fadeev[1], M. Korzhanova[1], S. A. Geshko[1], A. B. Komissarov[1], I. V. Kiseleva[2], D. A. Lioznov[1,3]

[1]Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg
[2]Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg
[3]Pavlov First Saint Petersburg State Medical University

✉ ksenandrey@yandex.ru

Аннотация

Риновирусы — одни из самых распространенных респираторных вирусов, генетическое разнообразие которых в России и в мире мало изучено. Они делятся на три вида: A, B, C. Известно 169 типов. Высокое разнообразие последовательностей геномов риновирусов затрудняет применение ампликонного секвенирования, поэтому для проведения мониторинга нами была модифицирована технология SMART. В работу взято 563 назофарингеальных образца, собранные в период 2018–2023 гг. Вид был определен у 54,71 % образцов (n = 308), среди них RV-A — 56,82 % (n = 175), RV-B — 6,82 % (n = 21), RV-C — 36,36 % (n = 112). Тип определен у 44,4 %, n = 250. Получено 24 полных генома.

Abstract

Rhinoviruses are one of most common respiratory viruses. Their genetic diversity is poorly studied in Russia and worldwide. Rhinoviruses are divided into three types: A, B, C. There are 169 known types. The high diversity of rhinovirus genome sequences complicates the application of amplicon sequencing. Therefore, we modified the SMART technology for monitoring purposes. A total of 563 nasopharyngeal samples collected from 2018 to 2023 were analyzed. The species was identified in 54.71 % of the samples (n = 308), among which 56.82 % (n = 175) were RV-A, 6.82 % (n = 21) were RV-B, and 36.36 % (n = 112) were RV-C. A total of 24 whole genomes were obtained.

Актуальность темы исследования

Риновирусы — одни из самых распространенных респираторных вирусов. Они принадлежат к семейству *Picornoviridae*, роду *Enterovirus* и делятся на три вида: риновирусы A (RV-A), риновирусы B (RV-B) и риновирусы C (RV-C), которые делятся на 169 типов [1].

Геном состоит из 5′-нетранслируемого региона (5′-UTR), открытой рамки считывания (ORF) и 3′-нетранслируемого региона (3′-UTR), который заканчивается poly-A-хвостом [2]. ORF делится на три участка, один из которых (P1) содержит гены, кодирующие структурные белки (VP1-VP4), а два других (P2 и P3) — неструктурные.

Для определения видовой принадлежности риновирусов применяют капиллярное секвенирование участков VP1 и VP4/VP2 [3, 4]. В связи с высокой вариабельностью геномов риновирусов дизайн праймерных панелей для их ампликонного секвенирования крайне затруднителен. В качестве альтернативы использованию праймерных панелей была выбрана технология SMART [5], использующая особенности обратной транскриптазы MMLV для введения служебных последовательностей в кДНК с последующей сиквенс-независимой амплификацией.

Для повышения эффективности применения протокола SMART на риновирусных геномах была проведена адаптация протокола — подобраны специальные праймеры, состоящие из двух частей:

– служебной последовательности (5’-конец), заранее известной;

– специфической части (3’-конец).

Для подбора специфической части были отобраны участки генома риновирусов длиной 9 оснований, располагающиеся перед poly-A-хвостом и повторяющиеся у большинства типов. Затем была проведена проверка частоты встречаемости выбранных участков на протяжении всей длины генома. Были отобраны наиболее часто

© А. Д. Ксенафонтов, А. В. Фадеев, М. Коржанова, С. А. Гешко, А. Б. Комиссаров, И. В. Киселёва, Д. А. Лиознов, 2024

встречаемые участки. После по принципу комплементарности к выбранным участкам были подобраны специфические части.

В общей сложности был подобран 21 праймер, из них для RV-A — семь, для RV-B — шесть, для RV-C — восемь.

Материалы и методы

Для апробации метода был использован изолят риновируса 1979 г. из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России.

В качестве материала служили назофарингеальные образцы от госпитализированных пациентов, собранные в рамках госпитального надзора за гриппом и ОРВИ (GIHSN) в период 2018–2023 гг. Критерием отбора служило значение порогового цикла (Ct) в ПЦР в реальном времени по данным тестирования с использованием «АмплиСенс ® ОРВИ-скрин-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). В работу брались образцы с Ct меньше 26. Всего было отобрано 563 образца.

Выделение нуклеиновых кислот осуществлялось набором для выделения на магнитных частицах NAmagp100, ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия). Обратная транскрипция РНК осуществлялась набором RNAscribe RT, ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия). Накопление продуктов обратной транскрипции осуществлялось посредством ПЦР с помощью набора «БиоМастер LR HS-ПЦР (2X)», ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия).

Библиотеку готовили с помощью набора MGIEasy Fast PCR-Free FS Library Prep Set (MGITech, Китай). Приготовленные библиотеки секвенированы при помощи набора для FCL SE100 на приборе DNBSEQ-G400 (MGITech, Китай).

Сборку геномов проводили на референсные последовательности из базы данных GenBank с использованием инструментов BWA, samtools, iVar.

Результаты

При апробации метода был получен полный геном риновируса A13, который был выложен в базу данных GenBank под номером PP997254.1.

При дальнейшем применении метода был определен вид у 54,71 % образцов (n = 308), у 44,4 % (n = 250) — тип. Было получено 24 полных геномов.

В результате генотипирования было выявлено преобладание RV-A над остальными риновирусами — 56,82 % (n = 175) от общего числа образцов, у которых определен вид. В меньшей степени детектировано RV-C — 36,36 % (n = 112). Меньше всего обнаружено RV-B — 6,82 % (n = 21). Было выявлено 73 типа RV-A, 15 типов RV-B и 45 типов RV-C.

Для валидации разработанного метода типирования риновирусов было проведено капиллярное секвенирование участка генома VP4/VP2 восьми риновирусов из данной выборки. Вид и тип совпали в каждом случае.

Обсуждение

Применение технологии SMART позволило определить видовую принадлежность риновирусов в 54,71 % исследованных респираторных образцов, а полученные результаты совпали с результатами капиллярного секвенирования. Разработанный протокол может найти свое применение в геномном надзоре за разнообразием риновирусов, циркулирующих в Российской Федерации.

Литература

1. Simmonds P., Gorbalenya A. E., Harvala H. et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses // Arch Virol. 2020. Vol. 165, No. 3. P. 793–797.

2. Jain S., Self W. H., Wunderink R. G. et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. adults // N. Engl. J. Med. 2015. Vol. 373, No. 5. P. 415–427.

3. da Costa Souza L., Bello E. J.M., Dos Santos E. M., Nagata T. Molecular and clinical characteristics related to rhinovirus infection in Brasília, Brazil // Braz. J. Microbiol. 2021. Vol. 52, No. 1. P. 289–298.

4. Wang W., He J., Liu Y. et al. Molecular genotyping of human rhinovirus by using PCR and Sanger sequencing // Methods Mol Biol. 2015. Vol. 1221. P. 39–47.

5. Claro I. M., Ramundo M. S., Coletti T. M. et al. Rapid viral metagenomics using SMART-9N amplification and nanopore sequencing // Wellcome Open Res. 2023. Vol. 6. P. 241.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-193

ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА МУКОЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ COVID-19 НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВАРИАНТА ВИРУСА СЕНДАЙ ШТАММА МОСКВА *

PROTECTIVE PROPERTIES OF MUCOSAL VACCINE AGAINST COVID-19 BASED ON RECOMBINANT VARIANT OF SENDAI VIRUS STRAIN MOSCOW

Г. А. Кудров, С. С. Зайнутдинов, И. С. Шульгина, А. В. Шиповалов, А. В. Зайковская, С. А. Боднев, О. В. Пьянков, 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. Shipovalov, A. V. Zaykovskaya, S. A. Bodnev, O. V. P'yankov, 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-Sdelta(M), которая экспрессирует полноразмерный белок spike (S) дельта-варианта SARS-CoV-2. На модели сирийского хомяка показано, что однократная интраназальная вакцинация Sen-Sdelta(M) индуцирует высокие титры вируснейтрализующих антител, специфичных к SARS-CoV-2, и защищает животных от развития коронавирусной инфекции.

Abstract

A vaccine construct Sen-Sdelta(M), which expresses the full-length spike (S) protein of SARS-CoV-2 delta variant, was developed based on Sendai virus strain Moscow. Using the Syrian hamster model, it was shown that a single intranasal vaccination with Sen-Sdelta(M) induces high titers of virus-neutralizing antibodies specific to SARS-CoV-2 and protects animals from the development of coronavirus infection.

Поскольку дыхательные пути являются основными входными воротами SARS-CoV-2, иммунизация слизистых оболочек имеет большое значение для предотвращения этой инфекции. По сравнению с инъекционными вакцинами, интраназальные вакцины обеспечивают дополнительные уровни защиты, такие как антигенспецифические секреторные IgA и эффекторные Т-клетки в слизистой оболочке верхних дыхательных путей, образуя, таким образом, мощный барьер против вирусной инвазии.

Вирус Сендай (род *Respirovirus*, семейство *Paramyxoviridae*) хорошо подходит для этих целей, поскольку он является респираторным вирусом и способен ограниченно репликацироваться в клетках бронхиального эпителия человека, не вызывая заболевания. Важным преимуществом использования вируса Сендай в качестве вакцинного вектора является высокая стабильность его генома и цитоплазматический тип репликации, что сводит к минимуму риск генетической интеграции вирусного генома в геном хозяина.

Несмотря на относительное снижение заболеваемости COVID-19, необходимость в разработке вакцин, особенно вакцин быстрого реагирования, сохраняется из-за возможности появления вызывающих озабоченность высокопатогенных вариантов SARS-CoV-2 (*Variants Of Concern*, VOC). В нашей работе мы протестировали прототип однократной интраназальной вакцины, которая является примером вакцины быстрого действия против дельта VOC SARS-CoV-2.

Согласно имеющимся в настоящее время данным, наиболее эффективным иммуногеном является полноразмерная копия S-белка SARS-CoV-2 в его нативной форме [1]. В своей работе мы использовали последовательность ДНК гена S природного изолята SARS-CoV-2 линии B.1.617.2 (дельта VOC) в качестве иммуногенного трансгена в рекомбинантном варианте вируса Сендай.

Рекомбинантный вариант Sen-Sdelta(M) вируса Сендай (штамм Москва) был сконструирован с использованием ранее созданного набора из четырех плазмидных ДНК, три из которых экспрессируют гены *N*, *P* и *L* штамма Сендай (вспомогательные плазмиды), а четвертая содержит полноразмерную ДНК-копию геномной

* Исследование выполнено в рамках гос. задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГЗ-37/21)

© Г. А. Кудров, С. С. Зайнутдинов, И. С. Шульгина, А. В. Шиповалов, А. В. Зайковская, С. А. Боднев, О. В. Пьянков, Г. В. Кочнева, 2024

РНК, включающую структурный элемент для вставки и экспрессии трансгенов между генами *P* и *M* [2]. Методом вестерн-блота было показано, что S-белок SARS-CoV-2 дельта VOC эффективно экспрессируется в клетках, инфицированных вирусом Sen-Sdelta(M), а также включается в рекомбинантные частицы вируса Сендай.

Однократное интраназальное введение Sen-Sdelta(M) сирийским хомякам индуцирует гуморальный иммунный ответ на антиген дельта-варианта SARS-CoV-2, средний геометрический титр (СГТ) антител класса IgG в ИФА составил 47568. Высокая нейтрализующая активность сывороток крови вакцинированных хомяков против дельта VOC SARS-CoV-2 также выявлена с СГТ 453.

На 35-й день после вакцинации хомяков из групп Sen-Sdelta(M) и контроля (n = 8 в каждой) интраназально заражали SARS-CoV-2 дельта VOC. После 6 дней инфицирования на пике вирусной репликации хомяков подвергали гуманной эвтаназии с использованием CO_2. Легкие и носовые раковины были собраны, и 10%-е гомогенаты (v/v в PBS) подготовлены для анализа вирусной нагрузки методами RT-qPCR и 50%-й инфекционной дозы в тканевой культуре ($ТЦПД_{50}$).

Исследование вирусной нагрузки в легких показало, что в группе вакцинированных только у 1 из 8 животных выявлялась РНК коронавируса (vРНК), а остальные образцы были ниже порога обнаружения. Разница в медианных значениях vРНК между вакцинированной и контрольной группами составила 8,97 $\log_{10}$ ($p < 0,001$, тест Манна — Уитни). Концентрация vRNA в назальных раковинах вакцинированных животных была на 4,39 $\log_{10}$ ниже в сравнении с контрольной группой ($p < 0,001$).

Все образцы легких и назальных раковин вакцинированных животных не содержали инфекционного SARS-CoV-2, в то время как в контрольной группе инфекционный титр составлял 4 $\log_{10}$ $ТЦТД_{50}$/мл. Таким образом, в группе вакцинированных хомяков выявлена 100%-я эффективность вакцины против SARS-CoV-2 дельта VOC.

Полученные данные показывают, что рекомбинантный Sen-Sdelta(M) является перспективным кандидатом в вакцины с защитными свойствами против вызывающих опасения вариантов SARS-CoV-2 уже при однократном интраназальном введении.

Литература

1. Ilinykh P.A., Periasamy S., Huang K. et al. A single intranasal dose of human parainfluenza virus type 3-vectored vaccine induces effective antibody and memory T cell response in the lungs and protects hamsters against SARS-CoV-2 // NPJ Vaccines. 2022. Vol. 7. P. 1–16.

2. Зайнутдинов С.С., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А. Набор рекомбинантных плазмидных ДНК для получения рекомбинантных вирусов Сендай штамм Москва (варианты). Патент РФ № 2787724. 2023.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-194

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ ОСПОВАКЦИННОГО ШТАММА АНКАРА ДЛЯ БЫСТРОГО ПОЛУЧЕНИЯ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН

DEVELOPMENT OF THE TECHNOLOGY PLATFORM BASED ON THE MODIFIED VACCINIA ANKARA FOR RAPID PRODUCTION OF VECTOR VACCINES

Р. Р. Минтаев, Д. В. Глазкова, О. В. Орлова, Ф. А. Урусов, Г. А. Шипулин, Е. В. Богословская

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России, Москва

R. R. Mintaev, D. V. Glazkova, O. V. Orlova, F. A. Urusov, G. A. Shipulin, E. V. Bogoslovskaya

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, FMBA of Russia, Moscow

✉ ramil.mintaev@fbb.msu.ru

Аннотация

Инфекционные заболевания, включая вирусные, являются одной из главных причин смертности и инвалидности. Вакцинация — наиболее эффективное средство защиты, но эффективность и безопасность вакцин часто неудовлетворительны. Цель исследования — разработка методов для быстрого получения иммуногенных векторных вакцин на основе MVA против РНК-вирусов. Нами были созданы кандидатные вакцины против вируса гриппа и вируса денге на основе вектора MVA.

Abstract

Infectious diseases, including viral diseases, are a major cause of death and disability. Vaccination is the most effective means of protection, but the efficacy and safety of vaccines are often unsatisfactory. The aim of this study is to develop methods for the rapid production of immunogenic MVA-based vector vaccines against RNA viruses. We created candidate vaccines against influenza virus and against dengue virus based on MVA vector.

Инфекционные заболевания, в том числе вирусные, согласно ВОЗ, являются одной из основных причин смерти или инвалидизации людей. Среди патогенных вирусов важнейшее клиническое значение имеют РНК-содержащие вирусы, представляющие значительную угрозу. Например, ежегодные эпидемии гриппа вызывают 3–5 млн случаев тяжелой болезни и примерно до 650 000 смертей. Другим примером является лихорадка, вызываемая вирусом денге. В последние десятилетия это заболевание стало серьезной проблемой общественного здравоохранения некоторых стран. Ежегодно регистрируется около 400 млн случаев заболевания и 22 тыс. смертей, что свидетельствует о ее широкомасштабном воздействии.

Вакцинация является наиболее эффективным и экономически целесообразным средством защиты. Однако, например, эффективность используемых сейчас сезонных вакцин против гриппа сильно зависит от совпадения антигенного профиля циркулирующих штаммов с рекомендованным ВОЗ вариантом. Для других вирусных инфекций также существует проблема эффективности и безопасности вакцин. Например, специфика выработки иммунного ответа против вируса денге, при котором имеется риск развития антителозависимого усиления инфекции, ограничивает разработку вакцин против этой инфекции. Существует несколько перспективных универсальных кандидатных вакцин от гриппа и вакцин от денге, но их эффективность или безопасность остаются далеки от приемлемого уровня. Ввиду этого по-прежнему остается актуальной задача разработки различных подходов, которые позволяли бы конструировать антигены для защиты от соответствующего патогена. Также важна доставка антигена в организм для эффективной презентации иммунитету. Существует множество платформ для создания вакцин, каждая из которых имеет свои достоинства и недостатки. Наибольший интерес представляют векторные вакцины на основе живых ослабленных вирусов. Среди различных платформ вирусных векторов одно из ключевых мест занимает модифицированный вирус осповакцины штамма Анкара (MVA), использование которого вызывает мощный врожденный иммунный ответ без применения адъювантов.

Целью настоящего исследования являлась разработка методов для быстрого получения иммуногенных векторных вакцин на основе MVA против РНК-содержащих вирусов на примере создания универсальных

© Р. Р. Минтаев, Д. В. Глазкова, О. В. Орлова, Ф. А. Урусов, Г. А. Шипулин, Е. В. Богословская, 2024

вакцин против гриппа и лихорадки денге. Нами была разработана методика быстрого получения векторных вакцин на основе MVA, сокращающая сроки разработки новых вакцин, в том числе вакцин против новых вариантов патогенных вирусов. На примере вируса гриппа была создана универсальная вакцина, защищающая на летальной мышиной модели не менее 68 % от широкого спектра штаммов подтипов гриппа A H1, H2, H3, H5 и имеющая иммуногенную активность против штаммов гриппа B. Также была создана иммуногенная вакцина против четырех серотипов вируса денге с учетом риска возникновения эффекта антителозависимого усиления инфекции. Созданные кандидатные вакцины прошли доклинические исследования безопасности и в будущем могут быть исследованы в клинических испытаниях. Набор разработанных методик, которые лежат в основе созданной платформы, может быть использован для создания вакцин против других значимых патогенов человека.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-195

КОНСТРУИРОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА ПРОТИВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С ХИМЕРНЫМ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКОМ [*]

CONSTRUCTION OF A SYNTHETIC BACTERIOPHAGE AGAINST *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* WITH A CHIMERIC RECEPTOR-BINDING PROTEIN

Е. Е. Михайлова, И. К. Байков, Н. В. Тикунова

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

E. E. Mikhaylova, I. K. Baykov, N. V. Tikunova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

✉ e.mikhailova2@g.nsu.ru

Аннотация

В ходе данного исследования была проверена гипотеза о влиянии N-концевой последовательности белка хвостовых шипов на стабильность синтетических бактериофагов, сконструированных на основе природных фагов KP192 и KP195, инфицирующих бактерию *Klebsiella pneumoniae*.

Abstract

In this study, the hypothesis of the effect of the N-terminal structural module of the tail spike protein on the stability of synthetic phages constructed on the basis of natural phages KP192 and KP195 infecting *Klebsiella pneumoniae* was tested.

Бактериофаги — бактериальные вирусы — могут выступать в качестве терапевтических агентов для лечения инфекций человека и животных, вызванных патогенными микроорганизмами. Применение природных фагов для борьбы с болезнетворными бактериями возможно, однако обеспечить быстрый поиск подходящих для терапии вариантов может быть затруднительно. Альтернативный подход — конструирование синтетических бактериофагов с необходимыми свойствами. В частности, используя современные подходы синтетической биологии и генной инженерии, можно сменить спектр хозяев природных бактериофагов за счет внесения изменений в гены, кодирующие белки хвостовых шипов (tsp-белки) или фибрилл (tf-белки) этих фагов. Однако нужно учитывать, что фаги — сложно организованные объекты, и для разработки четких стратегий по созданию синтетических химерных бактериофагов необходимо более детальное изучение организации и функционирования фаговых белков.

Ранее в лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН на основе природных клебсиельных фагов KP192 и KP195 был сконструирован синтетический бактериофаг KP195_tfAB192 путем полной замены в геноме фага KP195 последовательности, кодирующей белок хвостовых шипов, на пару генов tsp-белков фага KP192. В результате удалось переключить специфичность исходного бактериофага на штаммы *K. pneumoniae*, чувствительные к фагу KP192. Однако химерный фаг демонстрировал более низкую инфекционную активность в сравнении с фагом KP192 (при одинаковом физическом титре). Нами была выдвинута гипотеза, что причиной различий в инфекционных титрах может быть или неэффективная сборка хвоста химерного бактериофага, или сниженная стабильность хвоста этого фага, приводящая к его деградации у части вирионов и неспособности их заражать бактерии. В свою очередь, предположение о низкой стабильности хвоста химерного фага связано с различиями в аминокислотной последовательности N-концевой части белков хвостовых шипов у фагов KP192 и KP195. Чтобы проверить эту гипотезу, был сконструирован синтетический бактериофаг KP195_chAB192 с химерным рецептор-связывающим белком. Участок, кодирующий N-концевую часть tsp-белка в геноме фага KP195, остался неизменным, а последовательность, соответствующая С-концевой части, была заменена на фрагмент из генома KP192. Сборку генома фага KP195_chAB192 осуществляли методом TAR-клонирования — полученные с помощью ПЦР перекрывающиеся части геномов фагов KP192 и KP195 объединяли путем гомологичной

[*] Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 24-24-00553).

© Е. Е. Михайлова, И. К. Байков, Н. В. Тикунова, 2024

рекомбинации в дрожжах. На основе собранного генома были получены инфекционные фаговые частицы, после чего был проведен анализ внешнего вида бляшек и инфекционной активности фага KP195_chAB192 в отношении разных штаммов *K. pneumoniae*.

Было выявлено, что наличие «родного» N-концевого домена, взятого из tsp-белка фага KP195, не приводит к улучшению инфекционных свойств синтетического фага KP195_chAB192 в сравнении с фагом KP195_tfAB192. Следовательно, различия в N-концевой адаптерной части белков хвостовых шипов не оказывают такого значительного влияния на стабильность химерных фагов, как было предположено. Вместе с тем стало ясно, что сниженный инфекционный титр ранее полученного фага KP195_tfAB192 по сравнению с фагом KP192 был вызван не дестабилизацией хвоста, а дополнительными факторами, связанными с переходом от генома фага KP192 к геному KP195.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-196

ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР И ТЕХНОЛОГИЙ NGS ДЛЯ МОНИТОРИНГА ШИРОКОГО СПЕКТРА ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ

APPLICATION OF MULTIPLEX PCR AND NGS TECHNOLOGIES FOR IDENTIFICATION OF A WIDE RANGE OF VIRAL PATHOGENS

М. И. Надтока[1,2], А. В. Пересадина[1], А. Ю. Бухарина[1], М. Р. Аглетдинов[1,3], Г. В. Роев[1,3], К. Ф. Хафизов[1], В. Г. Акимкин[1]

[1]Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва
[2]Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва
[3]Московский физико-технический институт, Долгопрудный

M. I. Nadtoka[1,2], A. V. Peresadina[1], A. Y. Bukharina[1], M. R. Agletdinov[1,3], G. V. Roev[1,3], K. F. Khafizov[1], V. G. Akimkin[1]

[1]Central Research Institute of Epidemiology, Moscow
[2]Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow
[3]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

✉ maximnadtoka@gmail.com

Аннотация

Сегодня мало у кого остались сомнения в значимости проведения надзора за вирусными патогенами, вызывающими заболеваемость населения. Интеграция технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) в сферу диагностики вирусных инфекций позволила идентифицировать вирусы на основе анализа геномных последовательностей. Мы разработали методику идентификации широкого спектра вирусных патогенов при помощи мультиплексной ПЦР в сочетании с NGS.

Abstract

Nowadays there are no doubts on the importance of surveillance of viral pathogens that cause infections in our population. The integration of next-generation sequencing (NGS) into the viral infection diagnostics has made it possible to identify viruses precisely based on their genomic sequences. We have developed a technique for identification of a wide range of viruses using multiplex PCR combined with NGS.

Вирусы представляют собой одни из наиболее распространенных и филогенетически разнообразных биологических объектов на нашей планете. Как следствие, вирусные инфекции занимают лидирующие позиции среди ведущих причин смертности населения по всему миру. Несмотря на то что нам известно множество представителей вирусов, способных вызвать заболевание у человека, основное внимание в контексте лабораторной диагностики уделяется вирусам, обладающим пандемическим потенциалом, в частности вирусам гриппа или бета-коронавирусам (SARS, MERS, SARS-CoV-2). Несомненно, вспышки инфекций, вызванные данными патогенами, оставили наиболее заметный след в новейшей истории и безусловно заслуживают пристального внимания. Однако в постковидную эпоху устройство эпидемиологического надзора преобразилось, и сегодняшние тренды нацелены не только на надзор за потенциально пандемичными возбудителями инфекций, но и на постоянное отслеживание разнообразия циркулирующих патогенов.

Проведение такого мониторинга стало возможным благодаря активному внедрению технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) в область диагностики вирусных инфекций. В отличие от традиционных молекулярно-генетических методов, несомненно обладающих массой преимуществ, технологии NGS позволяют получать огромные объемы генетических данных, что, в свою очередь, открывает путь не только к точной идентификации вируса, но и к детальному изучению его свойств.

Существует несколько подходов к секвенированию вирусных патогенов, из которых наиболее часто используемым является ампликонное секвенирование. Преимущество данного подхода заключаются в генерации огромного количества специфичных прочтений и сведению неспецифичных, таких как прочтения фрагментов генома человека, к минимуму, что достигается за счет предварительной ПЦР-амплификации фрагментов вирусных геномов. К тому же, придерживаясь такого подхода к секвенированию, становится возможно использовать

© М. И. Надтока, А. В. Пересадина, А. Ю. Бухарина, М. Р. Аглетдинов, Г. В. Роев, К. Ф. Хафизов, В. Г. Акимкин, 2024

мультиплексные праймерные панели. Формат мультиплекс подразумевает объединение множества пар праймеров для амплификации разных мишеней в одной или нескольких пробирках. В рамках диагностики вирусных инфекций такой подход позволяет проводить одновременную амплификацию фрагментов геномов разных вирусов сразу для множества образцов, а его совокупное использование с технологиями NGS дает возможность произвести их анализ с исключительной точностью.

Нами разработана мультиплексная праймерная панель для амплификации и секвенирования коротких консервативных участков геномов 28 вирусных патогенов, в основном являющихся возбудителями респираторных заболеваний. Эта панель позволяет идентифицировать такие патогены, как вирусы гриппа, альфа- и бета-коронавирусы, респираторно-синцитиальные вирусы, парэховирусы, вирусы парагриппа, метапневмовирусы, бокавирусы, аденовирусы, вирусы ветряной оспы, цитомегаловирус и вирус Эпштейна — Барр. Праймеры в составе панели имеют на 5’-конце модификацию, представляющую собой адаптерную последовательность Nextera, что позволяет практически незамедлительно перейти к этапу баркодирования при подготовке ДНК-библиотек для секвенирования. Таким образом, использование разработанной панели не только существенно сокращает время пробоподготовки и ее стоимость, но и делает возможной точную идентификацию широкого спектра вирусов.

С помощью данной мультиплексной панели нами были исследованы две группы клинических образцов, где первая группа была представлена образцами (n = 300), прошедшими тестирование на SARS-CoV-2 с отрицательным результатом. Вторая группа состояла из образцов (n = 200), проанализированных при помощи тест-системы для одновременного выявления нескольких патогенов.

Мы провели секвенирование части успешно прошедших амплификацию образцов из первой группы (n = 60), в результате чего было установлено, что 50 % образцов содержали вирус Эпштейна — Барр; 22 % были представлены вирусом гриппа A (H3N2); в 11 % образцов идентифицирован респираторно-синцитиальный вирус человека подтипа B; 5,5 % образцов содержали вирус гриппа A (H1N1), аденовирус человека с генотипом B и метапневмовирус человека с генотипом A. По итогам исследования 131 образца из второй группы нами получены следующие результаты: 44 % образцов содержали вирус Эпштейна — Барр; в 32 % образцов обнаружен аденовирус человека с генотипом B; по 7 % пришлись на аденовирус человека с генотипом C и SARS-CoV-2; 3 % образцов содержали вирус парагриппа человека с серотипом 3; в 2 % образцов обнаружен вирус гриппа B, респираторно-синцитиальный вирус человека подтипа B и вирус гриппа A (H3N2).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-197

РАЗРАБОТКА ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА ДЛЯ БОРЬБЫ С КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ НА ОСНОВЕ КОМБИНАЦИИ ПРО- И ФАГОБИОТИКОВ

DEVELOPMENT OF A THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC PRODUCT FOR COMBATING INTESTINAL INFECTIONS BASED ON A COMBINATION OF PROBIOTICS AND PHAGOBIOTICS

М. А. Пасивкина[1], М. Н. Анурова[1,2], А. И. Лаишевцев[1,3], А. В. Алешкин[1]

[1] Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора
[2] Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России
[3] Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко РАН, Москва

M. A. Pasivkina[1], M. N. Anurova[1,2], A. I. Laishevtsev[1,3], A. V. Aleshkin[1]

[1] Gabrichevskii Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology
[2] 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

✉ pavlova.maashka@gmail.com

Аннотация

Выделено и охарактеризовано 4 новых литических бактериофага, проверена *in vitro* их антибактериальная активность. Подобрано 5 безопасных и производственно перспективных штаммов лактобактерий. Разработан лечебно-профилактический препарат на основе комбинации про- и фагобиотиков, эффективный при дисбиотических расстройствах кишечника, в том числе при острых кишечных инфекциях.

Abstract

Four new lytic bacteriophages have been isolated and characterized, and their antibacterial activity has been tested in vitro. Five safe and industrially promising strains of lactobacilli have been selected. A therapeutic and prophylactic preparation based on a combination of probiotics and phagobiotics has been developed, which is effective for dysbiotic intestinal disorders, including acute intestinal infections (AII).

Целью исследования является разработка безопасного лечебно-профилактического препарата на основе комбинации про- и фагобиотиков, эффективного при дисбиотических расстройствах кишечника, в том числе при острых кишечных инфекциях (ОКИ).

На фоне глобальной проблемы антибиотикорезистентности актуальна задача разработки альтернативных путей лечения и профилактики бактериальных инфекций. Благодаря новому комбинированному продукту возможно предотвратить развитие ОКИ и восстановить нормальную микрофлору кишечника человека.

Выделение, качественный и количественный анализ бактериофагов проводили биологическими (метод стекающей капли, метод Отто, метод Грациа), физическими (электронная микроскопия) и молекулярно-генетическими методами (полногеномное секвенирование). Изучение фармакокинетики бактериофагов при пероральном пути введения проводили на 12 кроликах породы Советская шиншилла. Для обнаружения фагов в биоматериале (кровь, моча и кал) использовали методы Spot-теста, Грациа и полимеразной цепной реакции.

Доклинические исследования 58 штаммов *Lactobacillus spp.*, взятых из музея коллекции нормальной микрофлоры ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, были проведены согласно МУ 2.3.2.2789-10, МУК 4.2.602-10. Лиофильное высушивание компонентов отрабатывали на лиофильной сушилке Epsilon 1-4 LSCplus (Martin Christ, Германия) в среде Файбича.

Выделено и охарактеризовано 4 литических бактериофага, активные в отношении персистирующих патогенных штаммов *Escherichia coli, Salmonella* Enteritidis*, Salmonella* Infantis*, Salmonella* Typhimurium, определены их морфологические, молекулярно-генетические свойства, параметры взаимодействия «фаг — клетка», чувствительность к инактивирующему действию физических и химических агентов (температура, буферные растворы

© М. А. Пасивкина, М. Н. Анурова, А. И. Лаишевцев, А. В. Алешкин, 2024

с различными значениями pH, хлороформ), изучена фармакокинетика при пероральном применении. Доказано наличие системного действия изучаемых фагов. Изучена безопасность (токсигенность, токсичность, безвредность, вирулентность и наличие дерматонекротических свойств) 58 штаммов лактобацилл. Подобрано 5 пробиотических производственно перспективных штаммов, полностью удовлетворяющих предъявленным требованиям. Отработана технология лиофильной сушки компонентов без потери титра компонентов. Для предотвращения губительного влияния соляной кислоты на бактериофаги в желудке принято решение о гранулировании комбинации про- и фагобиотиков и покрытии гранул кишечнорастворимой оболочкой.

Таким образом, подобрана безопасная и эффективная *in vitro* комбинация бактериофагов и лактобактерий, сформулирован препарат в виде кишечнорастворимых гранул для лечения и профилактики дисбиотических состояний кишечника человека, в том числе при ОКИ.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-198

ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ (*RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*) И ВАСИЛЬКА СИНЕГО (*CENTAUREA CYANUS*) *

ANTIVIRAL PROPERTIES OF EXTRACTS OF *CENTAUREA CYANUS* AND *RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*

М. А. Проценко[1], Е. И. Филиппова[1], Т. М. Шалдаева[2], Е. В. Макаревич[1], Ю. А. Пшеничкина[2], Е. П. Храмова[2], Н. А. Мазуркова[1]

[1] *Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово*
[2] *Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск*

M. A. Protsenko[1], E. I. Filippova[1], T. M. Shaldaeva[2], E. V. Makarevich[1], Yu. A. Pshenichkina[2], E. P. Khramova[2], N. A. Mazurkova[1]

[1] *State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo*
[2] *Central Siberian Botanical Garden SB RAS, Novosibirsk*

✉ protsenko_ma@vector.nsc.ru

Аннотация

Показано, что этанольные экстракты, полученные по разработанной нами технологии из листьев левзеи сафлоровидной *Rhaponticum carthamoides*, а также из цветков и листьев василька синего *Centaurea cyanus*, проявляют *in vitro* противовирусную активность в отношении вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

Abstract

It was revealed that ethanol extracts obtained using the technology we developed from the leaves of *Rhaponticum carthamoides*, as well as flowers and leaves of *Centaurea cyanus*, exhibit in vitro antiviral activity against the human influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2) and the virus avian influenza A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

Одной из ведущих причин смертности людей являются заболевания, вызываемые вирусами. В частности, вирус гриппа А оказывает немалый вред здоровью населения земного шара. Ситуацию усугубляет высокая скорость изменчивости вируса гриппа вследствие быстропротекающих мутаций, что приводит к снижению эффективности противовирусных препаратов.

Для лечения острых респираторных вирусных инфекций, в том числе гриппа, растения, как правило, используются в симптоматической и патогенетической терапии в качестве жаропонижающих, потогонных, отхаркивающих, противовоспалительных средств.

Следует все же отметить, что существуют и препараты растительного происхождения этиотропного действия. Одним из таких препаратов является «гипорамин», получаемый из листьев облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L. Гипорамин обладает выраженной противовирусной активностью в отношении различных штаммов вируса гриппа человека. Следовательно, поиск новых эффективных и безопасных противовирусных препаратов имеет неопровержимую актуальность.

В качестве объектов исследования использовали высушенные листья и цветки левзеи сафлоровидной *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin и василька синего *Centaurea cyanus* L., собранные на интродукционном участке ЦСБС в фазе цветения в 2019 г.

С помощью комплекса физико-химических методов проводили анализ на содержание различных групп биологически активных соединений в растительном сырье левзеи сафлоровидной и василька синего [1].

Этанольные экстракты из растительного сырья получали четырехкратной экстракцией 70%-м этанолом при температуре 60 °С и соотношении сырья к общему объему экстрагента 1 : 50. Охлажденные этанольные экстракты отфильтровывали от сырья, упаривали и досушивали в сушильном шкафу до влажности 5 % [2].

Тестирование растительных экстрактов на токсичность и противовирусную активность в отношении вируса гриппа А проводили на перевиваемой культуре клеток почки собаки кокер-спаниеля (MDCK).

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

© М. А. Проценко, Е. И. Филиппова, Т. М. Шалдаева, Е. В. Макаревич, Ю. А. Пшеничкина, Е. П. Храмова, Н. А. Мазуркова, 2024

Вируснейтрализующие свойства растительных образцов оценивали по изменению инфекционности вируса гриппа (титра) в монослое клеток MDCK. Определяли титры вируса в контроле и опыте и рассчитывали индекс нейтрализации вируса под влиянием экстрактов. Кроме этого, проводили оценку 50%-й токсической и 50%-й эффективной концентрации экстрактов с помощью колориметрического метода определения оптической плотности раствора тетразолиевого красителя МТТ, поглощенного живыми клетками в монослое. По соотношению 50%-й токсической и эффективной концентраций определяли индекс селективности [3].

Выявлено, что этанольные экстракты василька синего и левзеи сафлоровидной проявляли активность в отношении гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2) и вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1).

Индекс нейтрализации вируса гриппа человека A/H3N2 под действием экстракта из листьев левзеи сафлоровидной составил 4,50 lg, а индекс селективности в отношении этого вируса был равен 29,58. Индексы нейтрализации вируса гриппа человека под действием экстрактов из листьев и цветков василька синего составляли 4,50 и 2,50 lg соответственно. В то же время индексы селективности экстрактов их листьев и цветков василька синего составляли 245,58 и 118,68 соответственно. Индексы нейтрализации вируса гриппа птиц A/H5N1 под действием экстрактов из листьев левзеи сафлоровидной и василька синего составили 5,50 и 5,75 lg соответственно.

Результаты исследований противовирусной активности, свидетельствуют о потенциале разработки и создания новых лекарственных препаратов на основе этанольных экстрактов левзеи сафлоровидной и василька синего.

Литература

1. Шалдаева Т. М., Кукушкина Т. А., Пшеничкина Ю. А., Храмова Е. П. Биологически активные вещества некоторых растений семейства Asteracea // Химия растительного сырья. 2022. № 4. С. 181–188.

2. Проценко М. А., Костина Н. Е., Теплякова Т. В. Подбор питательных сред для глубинного культивирования дереворазрушающего гриба Daedaleopsis tricolor (Bull.) Bondartsev et Singer // Биотехнология. 2018. Т. 34, № 1. С. 45–51.

3. Selvan P., Murugesh N., Chandramohan M. et al. Anti-influenza virus activities of 4-[(1,2-dihydro-2oxo-3H-indol-3-ylidene) amino]-N-(4,6-dimethil-2-pyrimidin-2-yl)bensenesulphonamide and its derivatives // Antiviral Chem. Chemother. 2006. Vol. 17. P. 269–274.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-199

ПОРА ОБНОВЛЕНИЯ: ПРЕИМУЩЕСТВА АКТУАЛИЗАЦИИ NP КОМПОНЕНТА В СОСТАВЕ ЦЕЛЬНОВИРИОННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН *

TIME FOR AN UPDATE: THE BENEFITS OF UPDATING THE NP COMPONENT IN WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINES

А. Я. Рак, П. И. Прокопенко, В. В. Музурова, Л. Г. Руденко, И. Н. Исакова-Сивак

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

A. Ya. Rak, P. I. Prokopenko, V. V. Muzurova, L. G. Rudenko, I. N. Isakova-Sivak

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg

✉ alexandrak.bio@gmail.com

Аннотация

Слабая консервация (⩽ 41 %) иммуногенных $CD8^+$ Т-клеточных (иЦТЛ) эпитопов NP традиционных вакцинных доноров у современных NP и низкое содержание (⩽ 24 %) в их составе иЦТЛ-эпитопов NP современных вирусов гриппа А, а также ограниченная кросс-специфичность анти-NP антител, выработанных к рекомбинантным белкам и при инфекции различными штаммами, свидетельствуют о важности актуализации NP в составе вакцин.

Abstract

The poor conservation (⩽ 41 %) of immunogenic $CD8^+$ T-cell (iCTL) NP epitopes of traditional vaccine donors in modern NPs and the low content (⩽ 24 %) of iCTL NP epitopes of modern influenza A viruses, as well as the limited cross-specificity of anti-NP antibodies developed to recombinant proteins and during infection with different strains, suggest the importance of NP actualization in vaccine formulations.

Вакцинопрофилактика — одно из наиболее эффективных средств борьбы с распространением потенциально летальной гриппозной инфекции, до 5 млн случаев которой ежегодно регистрируется во всем мире [1]. Традиционно геном штаммов, составляющих основу цельновирионных (инактивированных, ИГВ и живых, ЖГВ) гриппозных вакцин, включает генетические сегменты, кодирующие поверхностные антигены (гемагглютинин и нейраминидазу) циркулирующих вирусных вариантов, а также неструктурные и внутренние белки стандартных вирусов-доноров 1933–1960 гг. выделения: A/WSN/1933 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1), A/Ленинград/134/17/57 (H2N2) и A/Ann Arbor/6/60 (H2N2). Несмотря на значительную консервативность NP, за более чем 60 лет аминокислотный состав этого компонента мог претерпеть изменения, затрагивающие иЦТЛ-эпитопы, служащие активаторами для $CD8^+$ Т-клеток в комплексе с MHC-I, и В-клеточные эпитопы, стимулирующие выработку анти-NP антител.

Целью работы стал анализ целесообразности актуализации NP в составе гриппозных вакцин методом оценки соответствия набора иЦТЛ-эпитопов NP традиционных вакцинных доноров и современных штаммов, а также анализ кросс-специфичности анти-NP антител.

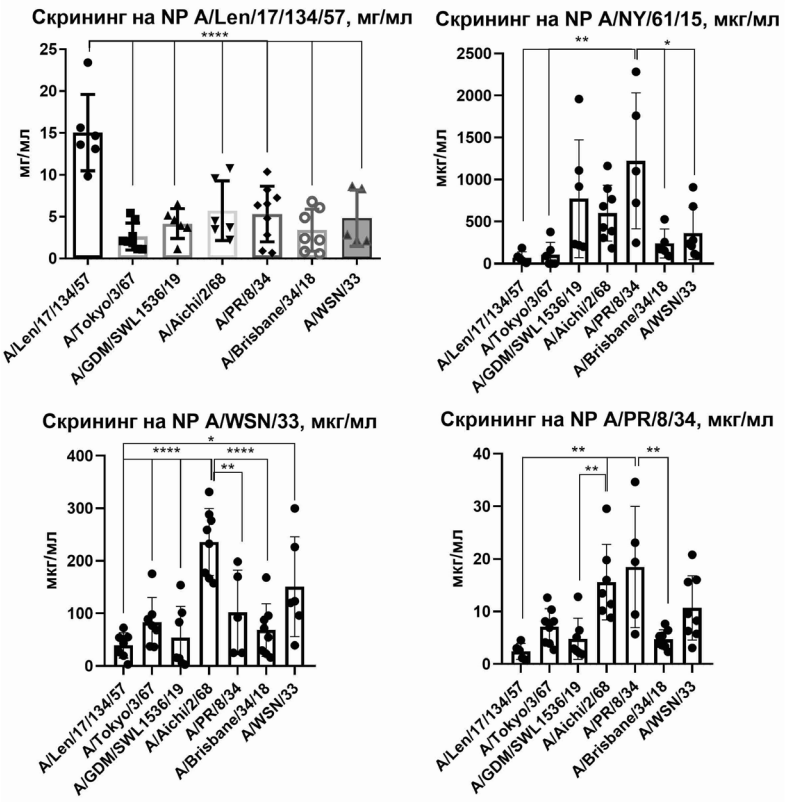
Анализ эпитопной консервативности *in silico* был выполнен для 1614 и 1767 штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2, соответственно, циркулировавших в 2009–2023 гг. (по данным из NCBI Influenza Virus Sequence Database). Для этого использовалась база данных IEDB (www.iedb.org), встроенные алгоритмы предсказания ЦТЛ-эпитопов NetCTL и сайтов протеолиза белка NetChop. Обнаруженные эпитопы с ⩽ 1 сайтом протеолиза картировали на аминокислотные последовательности NP с помощью алгоритма выравнивания ClustalO в программе JalView 2.8.1, а их иммуногенность и консервативность оценивали с помощью инструментов IEDB T-cell Immunogenicity Predictor Tool и Epitope Conservancy Assay соответственно.

Для оценки кросс-реактивности анти-NP антител полноразмерные рекомбинантные 6xHis-содержащие NP эволюционно отдаленных штаммов гриппа А экспрессировали в клетках *E. Coli* BL21(DE3) и выделяли методом иммобилизованной металл-аффинной хроматографии, а затем использовали для трехкратной иммунизации мышей линии BALB/c (по 20 мкг каждые 14 дней) и в качестве подложки в ИФА в концентрации 2 мкг/мл. Интактных мышей BALB/c также заражали восемью различными штаммами гриппа А дикого типа для получения антисывороток через 2 недели после инокуляции.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект №FGWG-2022-0001).

© А. Я. Рак, П. И. Прокопенко, В. В. Музурова, Л. Г. Руденко, И. Н. Исакова-Сивак, 2024

Антиген	Средняя концентрация анти-NP антител, выработанных при различных челленджах, мкг/мл						
	A/Len/17/134/57	A/Tokyo/3/67	A/GDM/SWL1536/19	A/Aichi/2/68	A/PR/8/34	A/Brisbane/34/18	A/WSN/33
NP A/Len/17/134/57	15047,3	2635,6	4183,1	5716,1	5326,2	3404,8	4829,6
NP A/NY/61/15	72,3	104,9	773,3	601,0	1222,8	240,3	474,9
NP A/WSN/33	39,2	83,1	54,0	236,2	102,0	68,4	150,8
NP A/PR/8/34	2,4	7,1	4,8	15,6	18,5	4,7	10,7



Иммуногенность NP различных штаммов вирусов гриппа А и кросс-реактивность анти-NP антител

Ожидаемо наибольшая доля иЦТЛ-эпитопов NP донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) сохраняется у современных вирусов подтипов H1N1 и H3N2 (5 из 12, 41,7 %), поскольку этот вирус был выделен на два десятилетия позже, чем доноры A/WSN/1933 и A/PR/8/34, только 16,7 и 23,1 % иЦТЛ-эпитопов NP которых представлены в циркулирующих в настоящее время вирусах гриппа А. Большинство NP-специфических иЦТЛ-эпитопов вакцинных прототипов, разработанных на основе антигенно устаревших вирусов гриппа А, не присутствуют в современных штаммах, и, напротив, представленность иммуногенных ЦТЛ-эпитопов NP антигена современных вирусов гриппа А у четырех наиболее популярных вакцинных доноров не превышает 24 %.

Несмотря на наличие перекрестной специфичности анти-NP антител, выработанных в ответ на иммунизацию рекомбинантными белками или при продуктивной инфекции, их способность к распознаванию гетерологичных антигенов оказалась снижена. Кроме того, варьировала иммуногенность различных NP (см. рисунок).

Полученные в работе данные свидетельствуют о том, что NP-специфические антитела и $CD8^+$ Т-клетки, генерируемые в ответ на вакцинацию штаммами, содержащими NP классических доноров, способны распознавать лишь небольшую часть иммуногенных эпитопов современных NP. При этом NP может быть актуализирован либо введением в состав вакцинных штаммов гена NP циркулирующих вирусных вариантов, либо направленным мутагенезом последовательностей NP вакцинных доноров.

Литература

1. Influenza. World Health Organization (3 october 2023). — World Health Organization fact sheet. URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal) (accessed: 19.07.2024)

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-200

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С СУБТИПА 1В И 3А У ИНФИЦИРОВАННЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛИЦ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ *

ANALYSIS OF RESISTANCE MUTATIONS IN HEPATITIS C VIRUS ISOLATES SUBGENOTYPES 1B AND 3A IN TUBERCULOSIS-INFECTED INDIVIDUALS IN THE TOMSK REGION

К. А. Свирин[1], О. Г. Половкова[2], Е. С. Федорова[2], М. Н. Камалов[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], M. N. Kamalov[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

Вирус гепатита С (ВГС) имеет высокую мутационную изменчивость, что приводит к появлению мутационных форм, имеющих резистентность к противовирусным препаратам прямого действия. Среди 25 изолятов ВГС субтипа 3а, обнаруженных у больных туберкулезом лиц в Томской области, в гене NS5A были обнаружены мутации Y93H и S/T62L, в гене NS3 выявили замены A166S/T. У девяти изолятов субтипа 1b в гене NS5A обнаружены мутации L31M и P58S, в гене NS5B выявлены замены L159F, C316, S556G.

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) has high mutational variability, which leads to the emergence of mutational forms that are resistant to direct-acting antivirals. Among 25 isolates of HCV subtype 3a found in tuberculosis patients in the Tomsk region, mutations Y93H and S/T62L were found in the NS5A gene, and A166S/T substitutions were detected in the NS3 gene. In nine isolates of subtype 1b, mutations L31M and P58S were detected in the NS5A gene; substitutions L159F, C316, and S556G were detected in the NS5B gene.

Гепатит С (ГС) — инфекционное заболевание печени, вызываемое одноименным вирусом, относящийся к семейству *Flaviviridae*. Своевременное обнаружение заболевания затруднительно, так как ГС в большинстве случаев протекает в хронической форме, которая может вовсе не иметь симптоматики. Персистенция вируса гепатита С (ВГС) в конечном итоге приводит к повреждению печени (циррозу печени, гепатоцеллюлярной карциноме). В мире насчитывается около 50 млн человек, инфицированных ВГС, и каждый год регистрируется около 1 млн зараженных впервые. В 2022 г. от осложнений, вызванных ВГС, погибло около 242 тыс. человек [1]. В России число больных ГС составляет 3–5 млн, а количество новоинфицированных — 45 тыс. человек в год [2]. К концу 2022 г. курс противовирусного лечения прошли около 20 % людей, имеющих хронический ГС [1].

Долгое время стандартом лечения ГС являлся рибавирин в сочетании с ИФН-α. На данный момент старую схему заменили противовирусные препараты прямого действия (ППРД), которые имеют большую эффективность и меньшее количество побочных эффектов [3]. Противовирусные препараты нацелены на неструктурные белки вируса (NS3, NS5A, NS5B), которые отвечают за ключевые процессы репликации и сборки вирионов [4]. Большой проблемой для полного искоренения ВГС является его высокая мутационная изменчивость. РНК-полимераза ВГС допускает ошибки со скоростью $1{,}5–2 \times 10^{-3}$ нуклеотидных замен на сайт в год [5]. Многие из них не влияют на вирус, часть приводит к критическим ошибкам, вызывающих гибель вирусного потомства, однако некоторые замены приводят к образованию генетических вариантов, имеющих устойчивость к лекарственным средствам. К настоящему времени для каждого из препаратов описано 6–10 клинически важных аминокислотных замен [6].

Цель нашей работы состояла в определении встречаемости замен аминокислотных остатков, приводящих к развитию лекарственной резистентности у различных субтипов ВГС.

Исследование проведено на 172 образцах сывороток/плазмы крови, полученных от пациентов, инфицированных туберкулезом. Проведено генотипирование выделенных изолятов ВГС по гену *core*. Для части изучае-

* Исследование выполнено в рамках ГЗ-2/22 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (№ 1220406001563 в ЕГИСУ НИОКТР).

© К. А. Свирин, О. Г. Половкова, Е. С. Федорова, М. Н. Камалов, А. С. Железнова, М. Ю. Карташов, 2024

мых изолятов субтипов 1b и 3a были определены полноразмерные нуклеотидные последовательности генов NS3, NS5A, NS5B с последующим анализом наличия в них мутаций резистентности к ПППД. Обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ MEGA XI.

Распределение субтипов в группе составило: 1b — 44,8 % (77/172; 95 % ДИ: 37,5–52,2), 3a — 36,6 % (63/172; 95 % ДИ: 29,8–44,0), 1a — 15,7 % (27/172; 95 % ДИ: 11,2–21,8), рекомбинантная форма 2k/1b — 1,7 % (3/172; 95 % ДИ: 0,7–4,8), 2a — 1,2 % (2/172; 95 % ДИ: 0,3–4,1).

Анализ 25 изолятов субтипа 3a на наличие мутаций резистентности показал, что ген NS5B не содержал мутаций, приводящих к развитию устойчивости к ПППД. Один изолят (4 %) имел в гене NS5A замену Y93H, которая снижает чувствительность к даклатасвиру, элбасвиру, пибрентасвиру, велпатасвиру, и 11 изолятов (44 %) содержали аминокислотные замены S62L/T/V, повышающие устойчивость к даклатасвиру. У шести изолятов (24 %) была обнаружена замена A166S/T в гене NS3, снижающая восприимчивость к глекапревиру.

Среди девяти изолятов субтипа 1b не было обнаружено мутаций резистентности в гене NS3. В гене NS5A были обнаружены замены L31M и P58S, которые были найдены у двух разных изолятов (11,1 %). Существует два препарата, нацеленных на NS5B, имеющих разный механизм действия: софосбувир и дасабувир. Было обнаружено две замены, приводящие к снижению чувствительности к софосбувиру: L159F и C316. Три изолята (33,3 %) содержали одновременно обе эти мутации. Также выявлено две замены, снижающие чувствительность к дасабувиру, — C316N и S556G. Замена S556G присутствовала у четырех изолятов (44,4 %). Обе замены C316N+S556G были найдены у одного изолята (11,1 %).

На данный момент ПППД создают все условия для полного искоренения ВГС, однако остаются некоторые проблемы, которые необходимо преодолеть в ближайшем будущем: недостаточный скрининг населения на наличие маркеров ВГС, недоступность терапии широким слоям населения по причине высокой стоимости препаратов, появление мутаций резистентности, доля которых будет расти при массовом использовании ПППД.

Литература

1. World Health Organization. Hepatitis C. URL: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c

2. Чуланов В. П., Городин В. Н., Сагалова О. И. и др. Бремя вирусного гепатита С в Российской Федерации: от реальной ситуации к стратегии // Инфекционные болезни. 2021. Т. 19, № 4. С. 52–63.

3. Pecoraro V., Banzi R., Cariani E. et al. New Direct-Acting Antivirals for the Treatment of Patients With Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials // J. Clinical Exp. Hepatology. 2019. Vol. 9, No. 4. P. 522–538.

4. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins // World J. Gastroenterology. 2007. Vol. 13, No. 17. P. 2406–2415.

5. Smith D. B., Pathirana S., Davidson F. et al. The origin of hepatitis C virus genotypes // J. Gen. Virology. 1997. Vol. 78, Pt 2. P. 321–328.

6. Pawlotsky J.-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens // Gastroenterology. 2016. Vol. 151, No. 1. P. 70–86.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-201

УЛУЧШЕННАЯ ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АДЕНОВИРУСА 5 ЧЕЛОВЕКА С КОМБИНАЦИЕЙ МУТАЦИЙ В *E3-19K* И *I-LEADER* *

ENHANCED ONCOLYTIC EFFICACY OF HUMAN ADENOVIRUS 5 WITH A COMBINATION OF MUTATIONS IN *E3-19K* AND *I-LEADER*

А. А. Степаненко[1,2], А. О. Сосновцева[1,3], А. А. Васюкова[1], М. П. Валихов[1], А. А. Чернышева[1], О. В. Абрамова[1], В. П. Чехонин[1,2]

[1] *Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва*
[2] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва*
[3] *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва*

A. A. Stepanenko[1,2], A. O. Sosnovtseva[1,3], A. A. Vasyukova[1], M. P. Valikhov[1,2], A. A. Chernysheva[1], O. V. Abramova[1], V. P. Chekhonin[1,2]

[1] *Serbsky National Medical Research Center of Psychiatry and Narcology, Moscow*
[2] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*
[3] *Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

✉ a.a.stepanenko@gmail.com

Аннотация

В результате комплексного подхода сравнительной оценки активности генно-модифицированных аденовирусов человека на панели опухолевых клеточных культур мы получили вирусный препарат с комбинацией модификаций в генах *i-leader* и *E3-19K*, который обладает усиленными онколитическими свойствами по сравнению с его генетическими предшественниками.

Abstract

As a result of a comprehensive approach to comparative assessment of the activity of genetically modified adenoviruses on a panel of tumor cell cultures, we obtained a unique viral preparation with a combination of modifications in the *i-leader* and *E3-19K* genes, which has enhanced oncolytic properties when compared with its genetic predecessors.

Для решения такой фундаментальной научно-медицинской проблемы, как низкая эффективность стандартной радио- и химиотерапии опухолей, могут быть адаптированы аденовирусы человека. Рекомбинантные онколитические вирусы на основе аденовируса 5 человека сегодня являются одними из самых тестируемых в клинических испытаниях противоопухолевой терапии. Онколитические аденовирусы в клинике характеризуются как безопасные, генетически стабильные и высоко иммуногенные препараты. К сожалению, внутриопухолевая инъекция онколитических аденовирусов не приводила к инфицированию большей части опухоли, так как вирусы не распространялись значительно от места инъекции. Онколитические аденовирусы могут быть улучшены за счет специфических генетических модификаций, направленных на усиление высвобождения потомства из инфицированных клеток и распространения вирусных частиц внутри опухоли.

Мы провели сравнительный анализ рекомбинантных онколитических аденовирусов, полученных методами генетической инженерии, с комбинациями мутаций в генах *E1B-19K*, *i-leader*, *E3-19K* и (или) *L2-pV* для выявления такого вируса, который демонстрирует наилучшую кинетику лизиса опухолевых клеток в монослое под агарозой путем оценки размера бляшек (тест на бляшкообразование). В целом в результате комплексной оценки онколитической активности генно-модифицированных аденовирусов на панели клеточных линий (пять независимых методов: оценка бляшкообразования, цитотоксичности, репродукции, проницаемости мембраны и маркеров иммуногенной клеточной гибели) мы подтвердили получение вирусного препарата с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader*, который обладает усиленными онколитическими свойствами по сравнению с его генетическими предшественниками.

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 22-75-10087).

© А. А. Степаненко, А. О. Сосновцева, А. А. Васюкова, М. П. Валихов, А. А. Чернышева, О. В. Абрамова, В. П. Чехонин, 2024

Далее мы выявили, что химиопрепарат «Верапамил» способен дополнительно усиливать распространение аденовируса с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader*. Эти данные указывают на то, что молекулярный механизм усиливающего распространение действия у «Верапамила» может быть отличным от модификаций в *E3-19K* и *i-leader*. Однако усиливающий эффект «Верапамила» зависел от типа клеточной культуры.

Мы комплексно подтвердили ранее опубликованные данные о роли аденовирусного белка смерти ADP в блокирующем действии химиопрепарата «Нелфинавир» на распространение аденовируса. Более того, мы показали, что ADP в принципе не нужен для эффективного бляшкообразования вирусом с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader*, однако присутствие *ADP* может способствовать бляшкообразованию в отдельных опухолевых культурах клеток. «Нелфинавир» оказывал существенное ингибирующее действие на бляшкообразование вируса с комбинацией модификацией в *E3-19K* и *i-leader* вне зависимости от присутствия *ADP*, хотя эффективность «Нелфинавира» зависела от типа клеток. Блокирующее действие «Нелфинавира» на вирус с комбинацией модификаций в *E3-19K* и *i-leader* и нокаутом *ADP*, но не на вирус с нокаутом *ADP* без модификаций в *E319K* и *i-leader*, может указывать на более сложный контекст-зависимый механизм действия «Нелфинавира», чем ранее предполагалось.

Наконец, мы доказали на панели опухолевых клеточных культур (n = 17), что вне зависимости от положения репортерного трансгена зеленого флуоресцентного белка (EGFP) в *DBP* или *E1A* локусе аденовируса и вне зависимости от наличия модификаций в *E3-19K* и *i-leader* вирусы с модификацией фиберного протеина RGD-4C (инсерция пептида в HI петлю головки фиберного протеина, позволяющего использовать интегрины αVβ3/αVβ5 как основной рецептор) в тестах на бляшкообразование в целом демонстрировали наибольшую эффективность, затем следовали вирусы с модификацией фиберного протеина Ad5/35 (CD46 выступает в качестве основного рецептора) и самыми неэффективными были вирусы с модификацией фиберного протеина Ad5/3 (десмоглеин 2 выступает в качестве основного рецептора).

Наши данные, полученные в результате комплексной сравнительной оценки рекомбинантных аденовирусов, однозначно указывают на то, что аденовирусы с комбинацией мутаций в *E3-19K* и *i-leader* проявляют большую онколитическую эффективность по сравнению с родительскими вирусами, причем онколитическая активность может быть усилена «Верапамилом» и подавлена «Нелфинавиром».

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-202

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СПЕКТРА АКТУАЛЬНЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT NEWCASTLE DISEASE VIRUS ANTIGEN TO CREATE VACCINE AGAINST A RANGE OF CURRENT CIRCULATING STRAINS

С. Е. Торопов, Е. М. Рябчевская, Е. А. Евтушенко, Н. А. Никитин, О. В. Карпова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

S. E. Toropov, E. M. Ryabchevskaya, E. A. Evtushenko, N. A. Nikitin, O. V. Karpova

Lomonosov Moscow State University

✉ stepan.toropov@mail.ru

Аннотация

Вирус болезни Ньюкасла (NDV) — возбудитель высококонтагиозного заболевания птиц. Серьезной проблемой создания вакцин против NDV является его высокая антигенная вариабельность. В рамках исследования спроектирован и получен полиэпитопный рекомбинантный антиген NDV. Иммунизация полученным антигеном приводила к выработке антител, способных взаимодействовать с NDV разных штаммов и генотипов.

Abstract

Newcastle disease virus (NDV) is the causative agent of a highly contagious disease in birds. An important issue in creating NDV vaccines is its high antigenic variability. In this study, a polyepitope recombinant antigen was designed and obtained. Immunization with the developed antigen led to the production of antibodies, which were able to interact with NDV of different strains and genotypes.

Вирус болезни Ньюкасла (Newcastle disease virus, NDV) — представитель рода *Orthoavulavirus* семейства *Paramyxoviridae*, возбудитель высококонтагиозного заболевания сельскохозяйственных и диких птиц. NDV распространен повсеместно и эндемичен во многих развивающихся странах. Инфицирование домашней птицы высоковирулентными штаммами NDV может привести к 100%-й смертности среди зараженных особей.

Для NDV характерна высокая антигенная вариабельность, в настоящее время выделяется более 20 различных генотипов, среди которых наибольшее значение в контексте распространения и патогенности имеют V, VI и VII генотипы. Единственный эффективный метод борьбы с NDV — вакцинация птиц в раннем возрасте. На рынке ветеринарных препаратов для профилактики NDV представлены живые аттенуированные и инактивированные вакцины. Большинство существующих вакцин разрабатывались на основе штаммов, относящихся к I и II генотипам. Использование таких (коммерчески доступных) вакцин не может обеспечить полную защиту от NDV из-за генетического расхождения между вакцинными и актуальными штаммами. В связи с этим поиск эффективных способов борьбы с болезнью Ньюкасла остается важной проблемой современной науки и ветеринарии. Одним из перспективных направлений в данной области является разработка рекомбинантных вакцин.

В рамках данного исследования разработан полиэпитопный рекомбинантный антиген, в состав которого входят протективные эпитопы белка HN, последовательности которых соответствуют наиболее распространенным циркулирующим штаммам NDV. В качестве основного эпитопа был выбран участок гемагглютинин-нейраминидазы (HN) с 341 по 368 а.о., где, согласно литературным данным, находятся два линейных эпитопа с вариабельностью по положениям 347 и 362. В исследовании были рассмотрены варианты замен (E-G, K-A и Q-K) для эпитопов 1–3, наиболее часто встречающихся у штаммов VII генотипа, обнаруженных после 2010 г. Кроме того, был использован высоко консервативный для разных штаммов NDV участок HN с 242 по 256 а.о. На основе вектора pQE-30 была создана генетическая конструкция, позволяющая экспрессировать в клетках *E. coli* целевой рекомбинантный антиген, включающий последовательности каждого из четырех эпитопов, повторенные дважды. Полученный антиген был назван Castle1. Было продемонстрировано, что сыворотки к NDV способны узнавать белок Castle1. Более того, показано, что иммунизация мышей белком Castle1 индуцирует выработку антител, способных эффективно связывать NDV различных генотипов. Были проведены предварительные

© С. Е. Торопов, Е. М. Рябчевская, Е. А. Евтушенко, Н. А. Никитин, О. В. Карпова, 2024

эксперименты, доказывающие наличие у этих сывороток способности вызывать торможение агглютинации эритроцитов при постановке РТГА. Отдельная серия экспериментов была проведена на животной модели цыплят, которые представляют собой основную группу риска при инфицировании NDV. Продемонстрировано, что иммунизация белком Castle1 способна индуцировать выработку антител, которые специфически взаимодействуют с препаратами NDV двух разных полевых изолятов, в том числе с высоковирулентным вирусом, относящимся к наиболее распространенному генотипу VII. Полученные результаты позволяют предположить, что разработанный белок Castle1 способствует эффективной выработке вирус-специфичных антител к различным штаммам NDV.

Таким образом, полученный в рамках проведенной работы рекомбинантный белок Castle1, содержащий эпитопы белка HN актуальных штаммов NDV, может стать основой для последующих этапов создания эффективной рекомбинантной вакцины против NDV. Основными преимуществами такой вакцины могут стать универсальность для широкого спектра циркулирующих штаммов и высокий профиль безопасности, характерный для рекомбинантных субъединичных вакцин. Более того, предложенный подход к созданию антигена позволит в будущем легко модифицировать панель эпитопов в его составе и тем самым оперативно реагировать на появление новых штаммов NDV, что позволит значительно снизить уровень заболеваемости болезнью Ньюкасла на птицеводческих хозяйствах в России и во всем мире.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-203

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БАКУЛОВИРУСНОЙ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

MEASUREMENT OF BACULOVIRUS DNA CONCENTRATION VIA QUANTITATIVE REAL-TIME PCR

Н. Р. Хабибуллин, Р. Д. Якупова, Е. О. Вартанова, М. С. Меркулова, А. О. Деревянко, Ю. Ю. Ивин

Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва

N. R. Khabibullin, R. D. Yakupova, E. O. Vartanova, M. S. Merkulova, A. O. Derevianko, Yu. Yu. Ivin

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow

✉ khabibullin_nr@chumakovs.su

Аннотация

Получение рекомбинантных белков в бакуловирусных системах экспрессии сопровождается значительными временными затратами на стадии пассирования вируса. Определение концентрации вирусной геномной ДНК с помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) позволяет частично преодолеть это ограничение. В исследовании получено уравнение линейной регрессии, позволяющее рассчитывать инфекционную активность бакуловируса на основании данных ПЦР-РВ.

Abstract

The production of recombinant proteins in baculovirus expression systems is accompanied by significant time costs, especially at the virus amplification stage. This limitation can be partially overcome if the PCR method is used for the virus titration. In this work, a linear regression plot of genome copy number versus baculovirus titers was produced.

Введение

Бакуловирусные векторные системы экспрессии (BEVS) широко используются для эффективной и биобезопасной наработки рекомбинантных белков в клетках насекомых. Ограничивающим фактором при использовании BEVS является высокая времязатратность на определение инфекционной активности при генерации вирусной массы. Использование метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) значительно ускоряет процесс анализа суспензии вирусных частиц с приемлемым для заражения титром.

Целью данной работы является отработка метода ПЦР-РВ оценки содержания ДНК бакуловирусов для использования при расчете инфекционной активности.

Материалы и методы

Объектом исследования были рекомбинантные бакуловирусы, полученные с помощью системы экспрессии Bac-to-Bac™ (Thermo Fisher Scientific Inc.). Концентрацию инфекционных бляшкообразующих единиц (БОЕ) бакуловирусов в культуре клеток Sf9 подсчитывали методом бляшек. Экстракцию бакуловирусной геномной ДНК из вируссодержащей жидкости (ВСЖ) осуществляли с помощью набора К-сорб (СИНТОЛ). ПЦР-РВ проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы с «горячим стартом» (Евроген) на приборе Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Концентрацию вирусной геномной ДНК в образцах ВСЖ определяли по накоплению флуоресцентного сигнала от зонда TaqMan при амплификации участка гена *gp64* [1]. Стандарт ДНК получали путем клонирования гена *gp64* из *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) в плазмиду pFastBacDual. Концентрацию стандартной плазмидной ДНК определяли спектрофотометрически при помощи NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific Inc.). В каждую постановку ПЦР-РВ включали четыре десятикратных разведения стандарта с известной концентрацией. Количество копий анализируемых ДНК-мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой. Регрессионные кривые строили по методу наименьших квадратов. Статистическую обработку данных выполняли с помощью программного обеспечения IBM SPSS Statistics. Количественные данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения.

© Н. Р. Хабибуллин, Р. Д. Якупова, Е. О. Вартанова, М. С. Меркулова, А. О. Деревянко, Ю. Ю. Ивин, 2024

Результаты

Типичная калибровочная кривая, получаемая из кривых амплификации десятичных разведений стандарта, представлена на рис. 1. По результатам ряда постановок эффективность ПЦР составляла 94,05 ± 3,51 %, коэффициент детерминации R^2 = 0,9961 ± 0,0036. В отрицательном контрольном образце не наблюдалось неспецифического накопления продукта.

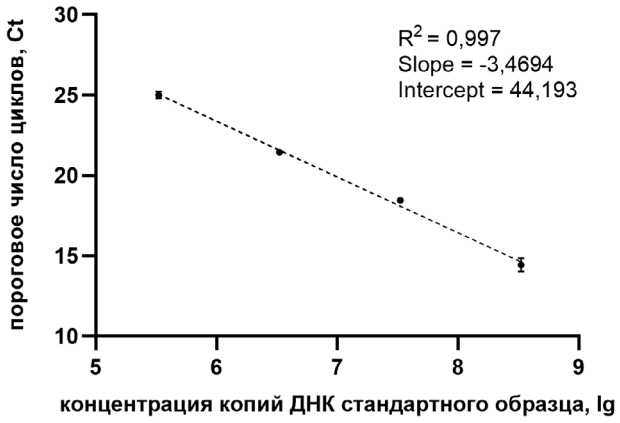


Рис. 1. Калибровочный график зависимости порогового числа циклов (cycle threshold, Ct) от концентрации копий ДНК стандартного образца

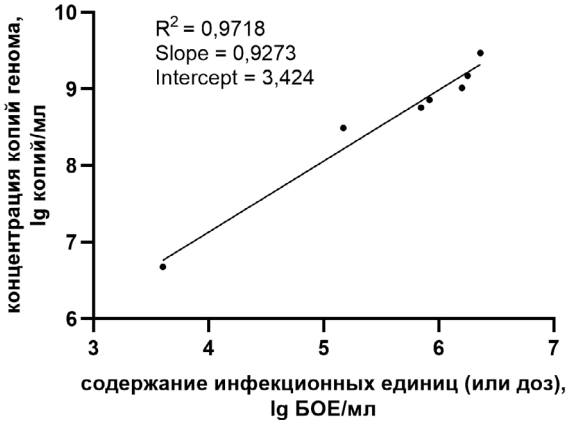


Рис. 2. Зависимость концентрации копий бакуловирусной геномной ДНК от содержания инфекционных единиц

Всего было проанализировано 7 рекомбинантных бакуловирусов, содержащих гены различных вирусных белков. Для каждого бакуловируса методом бляшек была определена концентрация инфекционных доз (которая варьировала от $10^{3,6}$ до $10^{6,4}$ БОЕ/мл), а также количество копий генома/мл ВСЖ. Регрессионная кривая, отражающая зависимость этих двух величин друг от друга, представлена на рис. 2. Коэффициент корреляции (r) равен 0,986, связь между исследуемыми признаками — прямая, теснота связи по шкале Чеддока — весьма высокая, зависимость признаков статистически значима (P = 0,000181). Средняя ошибка аппроксимации составляет 1,4 %, что указывает на правомерность полученного уравнения линейной регрессии. Среднее число копий генома, способное сформировать одну бляшку, составило 1110 ± 491 копий/БОЕ.

Заключение

Продемонстрирован вариант использования ПЦР-РВ для титрования бакуловирусов, что в дальнейшем позволит снизить временные затраты на наработку рекомбинантных белков в BEVS.

Литература

1. Hitchman R. B., Siaterli E. A., Nixon C. P., King L. A. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles // Biotechnol. Bioeng. 2007. Vol. 96, No. 4. P. 810–814.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-204

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ C_{60} И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АГЕНТОВ

USE OF C_{60} AND ITS DERIVATIVES AS ANTIVIRAL AGENTS

Д. Р. Храпунова, Д. Г. Укубаева

Оренбургский государственный медицинский университет

D. R. Khrapunova, D. G. Ukubaeva

Orenburg State Medical University

✉ drsafarova@mail.ru

Аннотация

Фуллерен — новая форма углерода, нашедшая применение в разных областях промышленности. После создания многочисленных производных C_{60} обнаружены новые возможности для использования его в вирусологии.

Abstract

Fullerene is a new form of carbon that has found applications in various industrial fields. After the creation of numerous C_{60} derivatives new opportunities for its use in virology have been discovered.

Интересным вектором нашей научно-исследовательской деятельности является изучение влияния наноструктур на микроорганизмы. Следует отметить, что наша экспериментальная работа лежала в области бактериологии [1–3]. Однако не менее увлекательным оказалось провести небольшое познавательное исследование применительно к вирусологии.

Человечество на протяжении веков встречает вызовы со стороны царства *Virae*. Помимо разработки вакцин, сывороток, иммуноглобулинов, актуальной проблемой является создание новых противовирусных лекарств. Интересным в этом направлении представляется исследование бакиболов и их производных.

Структура изучаемой аллотропной формы углерода известна всем, кто видел когда-либо футбольный мяч. Это и есть композиция из 60 атомов бакибола, или фуллерена, или футболена, или соединения C_{60}. Эти красивые симметричные молекулы размером почти один нанометр обладают уникальной способностью к образованию комплексов с другими молекулами и высокой реакционной способностью. Такие физико-химические свойства могут быть использованы для создания различных противовирусных агентов [4–7].

Целью нашей работы является исследование перспективы использования фуллерена и его производных в качестве противовирусных средств.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1) провести анализ литературы по изучению влияния C_{60} и его производных на структуру и функцию вирусных белков методами спектроскопии, рентгеноструктурного анализа, биохимическими методами;

2) оценить токсичность C_{60} и его производных для клеток и вирусов;

3) разработать рекомендации по применению C_{60} и его производных в вирусологии.

На основании анализа изученной литературы были получены следующие результаты.

Различные дериваты фуллерена могут быть потенциальными противовирусными агентами благодаря способности нарушать структуру и функцию вирусных белков одновременно с хорошей доступностью для живой клетки [8].

Комплементарное взаимодействие фуллеренового кора с вирус-специфической протеазой вируса иммунодефицита человека способствовало созданию производных C_{60} пиридиниевого, пиперидиниевого и пролинового типа в качестве ингибиторов не только протеазы, но и обратной транскриптазы [6, 9, 10, 12]. Производные пролинового типа также могут быть двойными ингибиторами протеазы и полимеразы вируса гепатита С [11, 12] (рис. 1).

Высоко гидратированные производные фуллерена (полигидроксифуллерены) предположительно вступают во взаимодействие с РНК-полимеразой вируса гриппа [13] (рис. 2).

Карбоксильные производные C_{60} ингибируют биологическую активность вируса простого герпеса и цитомегаловируса [14]. Фуллерен-производное малоновой кислоты показало подавляющее действие на протеазу штамма новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 [15] (рис. 3).

© Д. Р. Храпунова, Д. Г. Укубаева, 2024

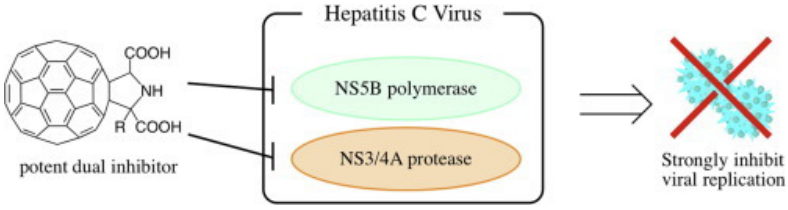


Рис. 1 [11]

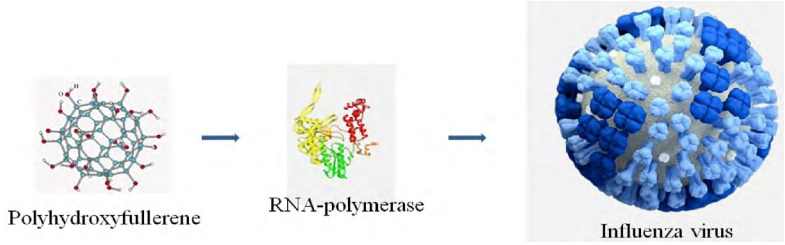


Рис. 2 [13]

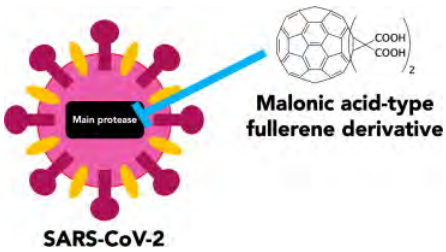


Рис. 3 [15]

Глико- и аминные производные фуллерена также изучаются в качестве антимикробных агентов [16]. По мнению исследователей, гликофуллерены показывают значительную ингибирующую активность для вируса Эбола, предположительно, в результате взаимодействия с мембранным белком DS-SIGN [17] (рис. 4).

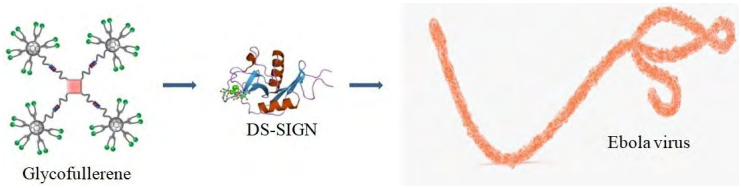


Рис. 4 [17]

В ходе работы были получены следующие выводы.

1. Фуллерен и его аддукты могут приводить к нарушению функционирования вирусных белков, оказывая стабилизирующее действие на их структуры что позволяет снизить инфекционность вирусов и замедлить их размножение.

2. Функциональная активность ферментов вирусов снижается под влиянием фуллерена и его производных.

3. C_{60} обладает высокой токсичностью при некоторой инертности по отношению к биологическим клеткам с кумулятивным эффектом. Несмотря на это, ряд производных C_{60} относительно низкотоксичны и обладают достаточной биосовместимостью.

Однако следует отметить, что подавляющее большинство разработок представлены исследованиями *in vitro* и *in silico* и ряд важных вопросов бионаномедицины остается открытым.

Литература

1. Большакова О. И., Михайлова Е. М., Жеребятьева О. О. и др. Смогут ли наночастицы стать альтернативой антибиотикам // Рос. нанотехнологии. 2023. Т. 18 (2). С. 147–159.

2. Жеребятьева О. О., Азнабаева Л. М., Большакова О. И. и др. Оценка наночастиц как перспективных альтернативных антимикробных препаратов // Дезинфекционное дело. 2023. Т. 2 (124). С. 14–22.

3. Bolshakova O., Lebedev V., Mikhailova E. et al. Fullerenes on a Nanodiamond Platform Demonstrate Antibacterial Activity with Low Cytotoxicity // Pharmaceutics. 2023 Vol. 15 (7). P. 1984.

4. Эрлих Г. В. Золото, пуля, спасительный яд: 250 лет нанотехнологий // Galileo. М.: КоЛибри; Азбука-Аттикус, 2012.

5. Пиотровский Л. Б., Киселев О. И. Фуллерены в биологии: монография // Рос. акад. мед. наук, Сев.-Запад. отд-ние. СПб.: Росток, 2006.

6. Пиотровский Л. Б. Фуллерены в дизайне лекарственных веществ // Рос. нанотехнологии. 2007. Т. 2 (7–8). С. 6–18.

7. Пиотровский Л. Б. Очерки о наномедицине: моногр. СПб.: Европ. дом, 2013.

8. Sharoyko V., Ageev S., Podolsky N. et al. Biologically active water-soluble fullerene adducts: Das Glasperlenspiel (by H. Hesse)? // J. Mol. Liquids. 2021. Vol. 323. P. 114990.

9. Yasuno T., Ohe T., Takahashi K. et al. The human immunodeficiency virus-reverse transcriptase inhibition activity of novel pyridine/pyridinium-type fullerene derivatives // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2015. Vol. 25 (16). P. 3226–3229.

10. Yasuno T., Ohe T., Kataoka H. et al. Fullerene derivatives as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and protease // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2021. Vol. 21. P. 127675.

11. Kataoka H., Ohe T., Takahashi K. et al. Novel fullerene derivatives as dual inhibitors of Hepatitis C virus NS5B polymerase and NS3/4A protease // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2016. Vol. 26 (19). P. 4565–4567.

12. Mashino T. Development of bioactive fullerene derivatives suitable for drug // Yakugaku Zasshi. 2022. Vol. 142 (2). P. 165–179.

13. Zaremba P., Zaremba A., Naumenko K. et al. *In vitro* and *in silico* studies of the antiviral activity of polyhydrated fullerenes against influenza A (H1N1) virus // Sci. Rep. 2023. Vol. 13 (1). P. 10879.

14. Федорова Н. Е., Климова Р. Р., Туленева Ю. А. и др. Производные карбоксильного фуллерена C_{60}: Эффективные микробициды против вируса простого герпеса и цитомегаловирусной инфекции *in vitro* // Менделеевские сообщения. 2012. Т. 22 (5). С. 254–256.

15. Katagishi D., Yasuda D., Takahashi K. et al. Fullerene derivatives as inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2023. Vol. 80. P. 129121.

16. Tanzi L., Terreni M., Zhang Y. Synthesis and biological application of glyco- and peptide derivatives of fullerene C_{60} // Eur. J. Med. Chem. 2022. Vol. 230. P. 114104.

17. Ramos-Soriano J., Illescas B., Perez-Sanchez A. et al. Topological and Multivalent Effects in Glycofullerene Oligomers as Ebola Virus Inhibitors // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23 (9). P. 5083.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-205

РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА УНИВЕРСАЛЬНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ВАКЦИННОГО КАНДИДАТА ПРОТИВ РОТАВИРУСА А *

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF A UNIVERSAL RECOMBINANT VACCINE CANDIDATE AGAINST ROTAVIRUS A

Н. Ш. Худайназарова, Д. Л. Грановский, Е. М. Рябчевская, О. А. Кондакова, М. В. Архипенко, Е. А. Евтушенко, Н. А. Никитин, О. В. Карпова

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

N. S. Khudainazarova, D. L. Granovskiy, E. M. Ryabchevskaya, O. A. Kondakova, M. V. Arkhipenko, E. A. Evtushenko, N. A. Nikitin, O. V. Karpova

Lomonosov Moscow State University

✉ nelly.khudaynazarova@bk.ru

Аннотация

Ротавирус А (РВА) является основной причиной тяжелого гастроэнтерита у детей до 5 лет во всем мире. Разработка вакцины против РВА осложнена значительным разнообразием циркулирующих штаммов РВА. В рамках настоящей работы был создан и охарактеризован универсальный рекомбинантный вакцинный кандидат для профилактики инфекций, вызванных РВА. Продемонстрирована способность вакцинного кандидата вызывать эффективный иммунный ответ у лабораторных животных.

Abstract

Rotavirus A (RVA) remains the leading cause of severe gastroenteritis in children under 5 years old worldwide. Vaccine development against RVA is challenged by the enormous diversity of circulating RVA strains. In this study, the recombinant universal vaccine candidate was developed and characterized for the prevention of rotavirus A infection. The vaccine candidate was demonstrated to elicit an effective immune response in laboratory animals.

Ротавирус А (РВА) является одним из видов рода *Rotavirus* (семейство *Reoviridae*). Несмотря на повсеместную вакцинацию против РВА, ротавирусная инфекция по-прежнему приводит к более чем 258 млн случаев диареи и 130 тыс. детских смертей ежегодно [1]. Это связывают прежде всего с недостаточной эффективностью существующих вакцин в некоторых регионах, что обусловлено значительным разнообразием циркулирующих штаммов РВА. Кроме того, все лицензированные в настоящий момент вакцинные препараты являются живыми аттенуированными и характеризуются широким списком противопоказаний, серьезными побочными эффектами и риском возникновения хронической инфекции, вызванной вакцинным штаммом. Недостатки лицензированных вакцин определяют необходимость разработки новых, более эффективных, универсальных и безопасных препаратов.

В рамках настоящего исследования был разработан и охарактеризован вакцинный кандидат для профилактики ротавирусной инфекции, вызванной ротавирусами группы А. В качестве основы для вакцины выступает рекомбинантный антиген РВА, созданный на базе последовательности поверхностного белка ротавируса А – VP8*. Последовательность рекомбинантного антигена состоит из двух частей: 1) короткого линейного нейтрализующего В-клеточного эпитопа РВА, высоко консервативного среди подавляющего большинства генотипов и штаммов РВА; 2) протяженного фрагмента VP8*, последовательность которого была разработана с использованием консенсусного подхода на основе широкого спектра современных изолятов РВА генотипа P[8], наиболее распространенного в мире и Российской Федерации. Данный рекомбинантный антиген был экспрессирован в системе *Escherichia coli*, очищен и охарактеризован. Было показано соответствие рекомбинантного антигена актуальным полевым штаммам ротавируса А, циркулирующим на территории Российской Федерации на основании взаимодействия с сыворотками к изолятам РВА, полученным от пациентов, госпитализированных с ротавирусной инфекцией. Продемонстрирована способность рекомбинантного антигена вызывать эффективный иммунный ответ у лабораторных животных. Кроме того, был предложен потенциальный адъювант для рекомбинантного антигена — сферические частицы (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ), разработанные ранее в лаборатории [2].

* Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ (№ 23-74-01008).

© Н. Ш. Худайназарова, Д. Л. Грановский, Е. М. Рябчевская, О. А. Кондакова, М. В. Архипенко, Е. А. Евтушенко, Н. А. Никитин, О. В. Карпова, 2024

Было показано, что СЧ ВТМ значительно увеличивали иммуногенность рекомбинантного антигена РВА у мышей при совместном введении. Полученные результаты дают основания полагать, что разработанный вакцинный кандидат позволит преодолеть недостатки существующих вакцинных препаратов и будет способен стимулировать эффективный иммунный ответ к большому разнообразию актуальных штаммов РВА. Преимуществом этой вакцины также является отсутствие в ее составе живого вируса, что обеспечит большую безопасность по сравнению с лицензированными препаратами. Предложенный дизайн антигена потенциально позволит получить перекрестный иммунный ответ против широкого спектра штаммов и генотипов РВА.

Литература

1. Troeger C., Khalil I.A., Rao P.C., Cao S., Blacker B.F., Ahmed T., Kang G. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years // JAMA Pediatrics. 2018. Vol. 172, No. 10. P. 958–965.

2. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kirpichnikov M.P. et al. Obtaining and characterization of spherical particles—new biogenic platforms // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. P. 194–197.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-206

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА САБИА *

DEVELOPMENT OF A REAL-TIME RT-PCR METHOD FOR DETECTING SABIA VIRUS RNA

С. А. Широбокова[1], А. В. Шабалина[1], И. С. Сухих[1], А. С. Долгова[1], В. Г. Дедков[1,2]

[1]Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера
[2]Институт медицинской паразитологии, тропической и трансмиссивной медицины им. Е. И. Марциновского Сеченовского университета, Москва

S. A. Shirobokova[1], A. V. Shabalina[1], I. S. Sukhikh[1], A. S. Dolgova[1], V. G. Dedkov[1,2]

[1]Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg
[2]Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Disease of Sechenov University, Moscow

✉ schirobokova.s@gmail.com

Аннотация

Вирус Сабиа (*Mammarenavirus brazilense*) — возбудитель бразильской геморрагической лихорадки, наименее изученной из лихорадок, вызываемых аренавирусами. Нами была разработана методика детекции РНК этого вируса на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Предел обнаружения метода составил 10^3 копий/мл.

Abstract

Sabia virus (*Mammarenavirus brazilense*) is the causative agent of Brazilian hemorrhagic fever, the least studied of the fevers caused by arenaviruses. A one-step qualitative reverse transcription polymerase chain reaction assay was developed to detect Sabia virus RNA in biological samples. The detection limit of the assay was 10^3 copies/ml.

Бразильская геморрагическая лихорадка (БГЛ), возбудителем которой является вирус Сабиа, является наименее изученной среди лихорадок, вызываемых аренавирусами. Переносчик в естественной среде до сих пор не установлен, но есть предположения, что вирус переносится грызунами из семейства *Cricetidae*, рода *Calomys* [1]. Уровень летальности среди населения Бразилии, вызванной БГЛ, составляет примерно 25–30 % [2]. В 2019 г. в Сан-Паулу были зафиксированы 2 клинических случая БГЛ, симптомы которых изначально считали проявлением желтой лихорадки, распространившейся в тот период в городе. Молекулярная диагностика была проведена на образцах крови и мочи пациентов и дала положительные результаты на БГЛ и отрицательные на желтую лихорадку [2]. На сегодняшний день методов лечения и вакцинации против БГЛ не разработано. Вирус Сабиа может передаваться от человека к человеку. Люди, инфицированные данным вирусом, могут передавать патоген через кровь, слюну, мочу, сперму, дыхательные выделения и другие биологические жидкости организма [3]. В связи с этим представляется целесообразным разработка способа выявления данного вируса у потенциально больных пациентов, особенно у пребывающих из эпидемически неблагоприятных регионов по БГЛ.

Целью исследования является разработка ОТ-ПЦР в реальном времени для детекции РНК вируса Сабиа в биологических образцах.

Был проведен филогенетический анализ последовательностей геномов вируса, представленных в базе GenBank. В качестве мишени для посадки праймеров и зонда был выбран наиболее консервативный фрагмент гена L, кодирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу вируса Сабиа. Были подобраны условия реакции, соответствующие термодинамическим параметрам праймеров и зонда, для достижения максимальной чувствительности и специфичности. Для проверки чувствительности были собраны защищенные РНК-контроли на основе модифицированного бактериофага MS2, содержащие целевой участок генома вируса *M. brazilense*.

* Исследование выполнено по федеральному проекту «Санитарный щит».

© С. А. Широбокова, А. В. Шабалина, И. С. Сухих, А. С. Долгова, В. Г. Дедков, 2024

Аналитическая специфичность системы, составившая 100 %, была проверена на панели из 13 разных видов вирусов. Предел обнаружения метода составил 1×10^3 копий/мл.

В результате проведенных исследований был разработан метод выявления РНК вируса Сабиа на основе ПЦР с обратной транскрипцией, тем самым расширены инструменты эпиднадзора по мониторингу носительства вируса Сабиа у лиц, прибывающих из эпидемиологически неблагоприятных по данной инфекции регионов.

Литература

1. Wilson D. E. and Cole F. R. Common Names of Mammals of the World // Smithsonian Institution Press, Washington and London. 2000. Vol. 82, is. 3. P. 882.

2. Nastri A. C., Duarte-Neto A. N., Casadio L. V. et al. Understanding Sabia virus infections (*Brazilian mammarenavirus*) // Travel Medicine Infectious Disease. 2022. Vol. 48. P. 1–9.

3. Lendino A., Castellanos A. A., Pigott D. M. et al. A review of emerging health threats from zoonotic New World mammarenaviruses // BMC Microbiol. 2024. Vol. 24. P. 1–9.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-207

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОВИРУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СЛУЧАЯМИ СЕРОЗНЫХ МЕНИНГИТОВ В 2023 г. В РФ

MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERISTICS OF ENTEROVIRUSES ASSOCIATED WITH CASES OF SEROUS MENINGITIS IN 2023 IN THE RUSSIAN FEDERATION

Е. В. Яковчук[1], Е. Ю. Шустова[1], Л. И. Козловская[1,2]

[1]*Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва*
[2]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*

E. V. Yakovchuk[1], E. Yu. Shustova[1], L. I. Kozlovskaya[1,2]

[1]*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*
[2]*Sechenov First Moscow State Medical University*

✉ yakovchuklisa@gmail.com

Аннотация

Изучены неполиомиелитные энтеровирусы, полученные в 2023 г. от пациентов с диагнозом «серозный менингит». Определены типы вирусов: CVB5, CVB4, E6, E7, E11, E18, E30; для наиболее часто встречающихся (CVB5, E6, E30) проведен филогенетический анализ.

Abstract

Non-polio enteroviruses obtained in 2023 from patients with meningitis were studied. Virus types identified: CVB5, CVB4, E6, E7, E11, E18, E30; for the most frequently occurring ones (CVB5, E6, E30), phylogenetic analysis was carried out.

Энтеровирусы принадлежат к семейству *Picornaviridae*; они подразделяются на более чем 100 патогенных для человека типов, относящихся к 4 видам. Энтеровирусная инфекция чаще всего протекает в бессимптомной или легкой форме, однако может также сопровождаться различными клиническими проявлениями, включая поражения ЦНС. Неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ) являются основной причиной заболеваемости асептическим менингитом [1]. В настоящей работе исследуется спектр НПЭВ, изолированных от пациентов с диагнозом «серозный менингит» в 2023 г. в Москве.

Для изолятов НПЭВ, выделенных от пациентов и из объектов окружающей среды в РФ и странах СНГ, секвенировали фрагменты генома, кодирующего капсидный белок VP1, по методу Сэнгера. Тип вируса определяли с помощью онлайн-ресурса BLAST. Нуклеотидные последовательности выравнивали в программе Mega X. Построение филогенетических древ с использованием молекулярных часов производили с помощью программы BEAST v1.4.8.

В 2023 г. всего было выделено 167 изолятов НПЭВ; 27 из них были получены от пациентов с менингитом. Все вирусы, ассоциированные со случаями менингита, относились к виду *Enterovirus betacoxsackie*. Самым распространенным типом был CVB5 — 41 % изолятов; за ним следовали E6 — 30 % изолятов; по 7 % изолята E18, E30 и CVB4; по 4 % — E11 и E7. Для вирусов типов CVB5, E6 и E30 был проведен филогенетический анализ. Изоляты E30 вошли в один кластер с возрастом ближайшего общего предка (БОП) около 3 лет, с ними группировались и другие последовательности E30, выделенных в России в 2023 г. Все они относились к геногруппе eC2, и ближайшими к ним зарубежными вирусами были E30 из Европы и Турции 2017–2019 гг. Данная геногруппа E30 ранее не обнаруживалась на территории РФ, можно предположить завоз вируса из Европы или Западной Азии. Вирусы E6 распределились между геногруппами E и F, возраст БОП — около 50 лет. При этом в группу F вошли также вирусы 2021–2022 гг., а в группу E — только 2023 г. Вирусы CVB5 также разделились на две геногруппы с БОП около 160 лет. Часть вирусов относилась к геногруппе B, к ним были генетически близки изоляты из России 2021–2022 гг. Другая часть относилась к геногруппе E, внутри которой сформировала монофилетический кластер. В эту группу также вошли изоляты, выделенные от пациентов с паралитическими заболеваниями. Ближайшими к ним по происхождению были вирусы из Китая 2014–2018 гг.

© Е. В. Яковчук, Е. Ю. Шустова, Л. И. Козловская, 2024

Таким образом, в 2023 г. в России заболеваемость менингитом была ассоцирована с инфекцией НПЭВ типов CVB5, CVB4, E6, E7, E11, E18, E30. Филогенетический анализ показал, что на территории России коциркулируют CVB5 и E6 различных геногрупп. В то же время изоляты E30 относились к одной геногруппе, представители которой ранее не были обнаружены в РФ.

Литература

1. Ponomareva N.V., Novikova N.A. Neurotropic enteroviruses (*Picornaviridae: Enterovirus*): predominant types, basis of neurovirulence // Probl. Virol. 2023. Vol. 68. P. 479–487.

РАЗДЕЛ V

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-208

MODULATION OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE FUNCTIONS OF *EX VIVO* GENERATED MURINE MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS WITH CYTOKINES AND TUMOR CONDITIONED MEDIUM *

M. S. Awad[1,2], M. A. Zenkova[1], O. V. Markov[1]

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

✉ mona.awad.edu@gmail.com

Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are immune cells linked to immunosuppression in cancer, inflammation, autoimmune diseases, and transplantation. They comprise polymorphonuclear (PMN-MDSCs) and monocytic (M-MDSCs) subsets resembling neutrophils and monocytes. MDSCs suppress other immune cells, primarily T cells.

A comprehensive understanding of MDSC biology and mechanisms of action, including the identification of novel markers and therapeutic targets, is essential for effectively overcoming tumor-induced immunosuppression and developing efficacious interventions for inflammatory and autoimmune diseases. However, the absence of a standardized *ex vivo* MDSC generation protocol represents a significant obstacle to comprehensive investigations of these cells, underscoring the urgent need for the development of such methodologies within the field of immunology.

In this work, we compared six different protocols for generating MDSCs *ex vivo*. Murine bone marrow precursors were used to generate MDSCs *ex vivo*. The protocols involved the use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), either solely or in conjunction with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) or interleukin-6 (IL-6), with or without the addition of tumor conditioned medium (TCM), substances known to promote MDSC expansion and activation *in vivo* [1]. The resulting MDSCs were characterized in terms of their morphology, phenotype, immunosuppressive function on T cell proliferation, and gene expression of crucial immunosuppressive factors.

Analysis revealed that all experimental protocols yielded approximately 75% MDSC, comprising 25% monocytic and 50% polymorphonuclear MDSCs. The results showed that the combination of GM-CSF with IL-6 or G-CSF increased the M-MDSC and PMN-MDSC yields, respectively, compared to GM-CSF alone. Protocols incorporating IL-6 was found to significantly reduce MDSC maturation and differentiation while increasing the expression of immunosuppressive factors. All generated MDSCs effectively suppressed T cell proliferation capacity *ex vivo*, with GM-CSF and G-CSF+GM-CSF protocols showing slightly better performance. Notably, combining protocols with tumor conditioned medium led to MDSCs with decreased immunosuppressive capabilities. These findings contribute to our understanding of the optimal conditions for the tuning of specific characteristics of MDSCs during generation *ex vivo*. The results may facilitate the development of novel approaches to correct the immunosuppressive properties of MDSCs and enhance the targeting of therapeutics to these cells.

References

1. Trikha P., Carson W. E. Signaling pathways involved in MDSC regulation // Biochim. Biophys. Acta — Rev. Cancer. 2014. Vol. 1846, No. 1. P. 55–65.

* The study is supported by RSF (project #19-74-30011).

© M. S. Awad, M. A. Zenkova, O. V. Markov, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-209

INTELLIGENT MAGNETOELECTRIC DRUG-DELIVERING NANOPARTICLES (IMDDNS) FOR REAL-TIME SENSING AND ADAPTIVE THERAPY IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT

A. Darwish, A.A. Eldeeb

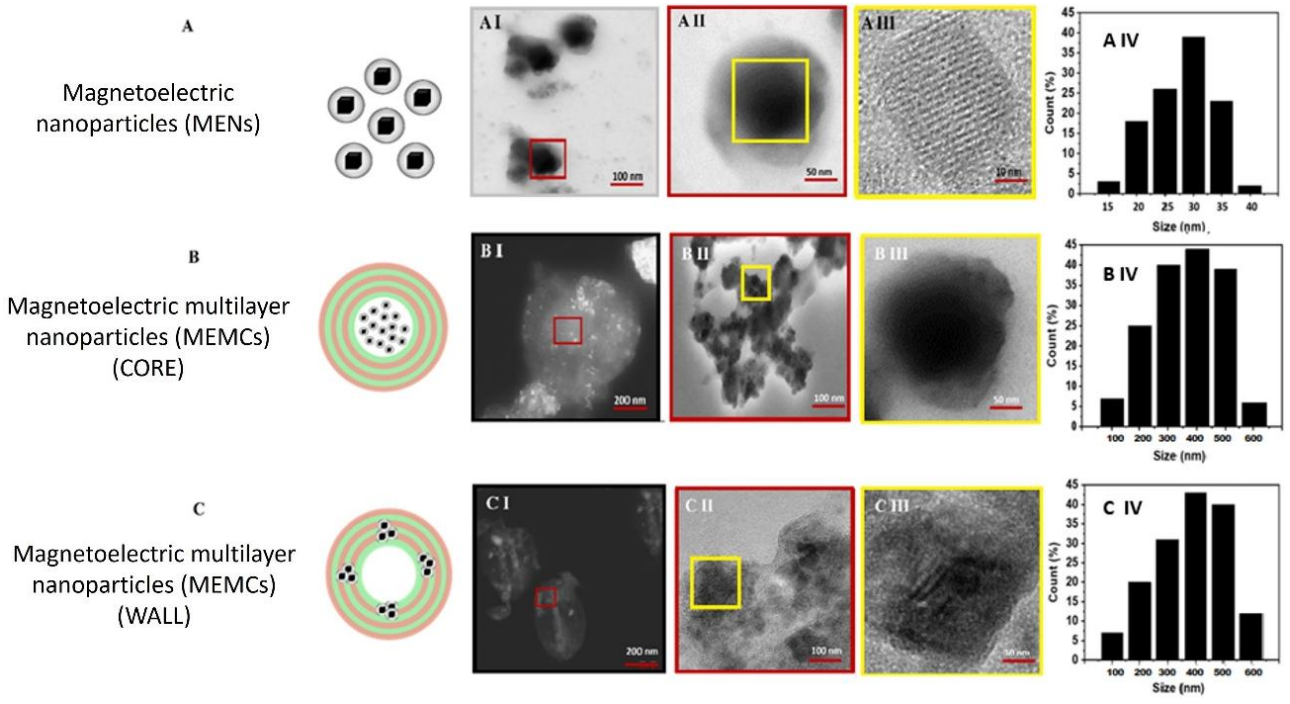
SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg

✉ ayadarwish@itmo.ru

Abstract

The complexity and heterogeneity of the tumor microenvironment (TME) present significant challenges to effective cancer therapy. To address these challenges, we have developed IntelliMeg, Intelligent Magnetoelectric Nanoparticles engineered for real-time environmental sensing and adaptive therapeutic delivery. This innovative platform integrates advanced materials science with molecular biology, offering a sophisticated approach to targeted cancer treatment.

The synthesis of cobalt ferrite@barium titanate (CFO@BTO) nanoparticles took a place using a co-precipitation method, followed by comprehensive characterization through TEM, SEM, XRD, and SQUID to ensure optimal size, morphology, and magnetoelectric properties. Surface functionalization of these nanoparticles is achieved by conjugating targeting ligands and therapeutic agents, enhancing their specificity and therapeutic efficacy.



Schematic representative of Magnetoelectric nanoparticles (MENS) and magnetoelectric multilayer capsules (MEMCs) structures (A I, B I, C I). Other images are representative TEM images of the Magnetoelectric nanoparticles (MENs), ME. Multilayer polymer capsules with incorporated Magnetoelectric nanoparticles (MENs) inside the cavity (**CORE**) and between polymer layers (**SHELL**). (A IV, B IV, C IV) size distribution

A distinctive feature of IntelliMeg is the integration of DNA nanorobots. These nanorobots are modulated by cancer marker concentrations, enabling precise mRNA cleavage and subsequent therapeutic gene silencing. Our DNA nanorobots have four modules: activation, computational, sensory, and delivery [1]. IntelliMeg NPs play the role of delivering DNA nanorobots to specific sites. To address the dynamic conditions within the TME, multiple sensing modalities were incorporated into the nanoparticle design. FITC-dextran serves as a pH sensor, platinum porphyrins detect oxygen levels, and DCFDA is used for ROS sensing [2]. The successful integration and functionality of these sensors are

confirmed through fluorescence spectroscopy, ensuring precise and reliable detection capabilities. This platform has the potential to significantly improve treatment outcomes.

Our research highlights the transformative potential of IntelliMeg as a cutting-edge platform for intelligent cancer therapy. This approach not only enhances the precision of treatment but also establishes a foundation for future advancements in theranostic applications, thereby addressing critical challenges in oncology.

References

1. Nour M.A.Y., Drozd V.S., Lemeshko E.A. et al. RNase H-dependent DNA thresholder modulated by cancer marker concentration // Chemical Communications. 2024. Vol. 60 (24). P. 4427–4432.

2. Nguyen T.M. et al. Unveiling the Neural Environment in Cancer: Exploring the Role of Neural Circuit Players and Potential Therapeutic Strategies // Intern. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, No. 12. P. 4324.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-210

DESIGN AND DEVELOPMENT OF A PROTECTIVE DNA NANO-TUBE USING DNA ORIGAMI FOR ENHANCED CANCER GENE THERAPY*

Z. Hussein[1], A.A. Eldeeb[1], D.M. Kolpashchikov[2]

[1] *SCAMT Institute, ITMO University, Saint Petersburg*
[2] *University of Central Florida, Orlando, USA*

✉ zain@scamt-itmo.com

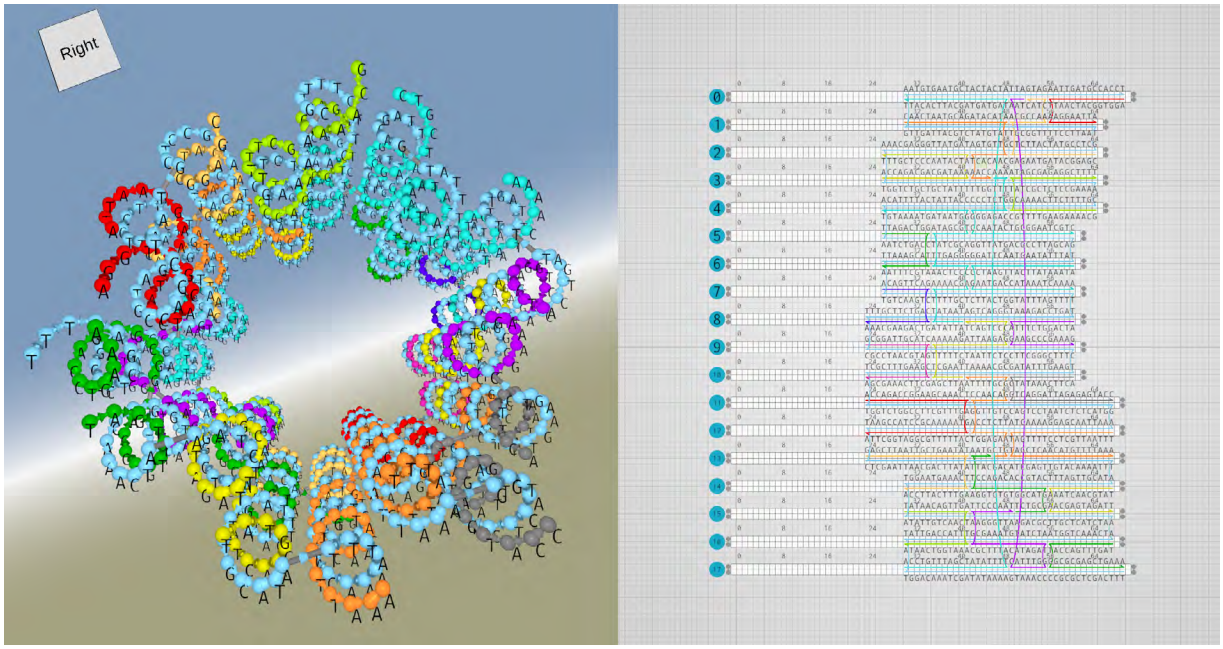
Abstract

In this study, we used DNA origami designing methods to develop a cost-effective DNA nano-tube, serving as a protective scaffold for incorporated therapeutic nucleic acids (TNAs). Our mini DNA origami construct is designed to provide protection from intracellular nucleases and to allow cancer markers entry for the selective release of TNAs.

Gene interference strategies based on therapeutic nucleic acids (TNAs), including, antisense oligonucleotides (ASO), RNA interference, ribozymes, and DNAzymes, provide promising pathways for treating human diseases [1]. However, each strategy comes with its own set of benefits and limitations that hinder the clinical use of these agents. Major challenges include low stability, difficulties in targeting specific molecules, and inefficient intracellular delivery, leading to poor selectivity, suboptimal efficiency, and off-target effects [2].

Introduced by Paul W.K. Rothemund in 2006, DNA origami allows for the precise folding of DNA into specific structures. This groundbreaking technique has expanded possibilities for biomedical applications, inspiring the development of novel, marker-activated nanomachines for targeted gene therapy [3, 4].

Through careful design, modification, and evaluation of stable DNA origami structures, this research seeks to develop a highly selective and effective approach for tumor therapy. The initial nano-tube design, created using caDNAno software, features 18 dsDNA helices formed by a 700-nucleotide-long scaffold and 24 staples ranging from 18 to 38 nucleotides. This design was further optimized with the ENSnano software, ensuring the scaffold's position minimizes anti-patterns in the staple sequences (see Figure). Remarkably, this nano-tube requires only a few amount of staples and a relatively short scaffold, eliminating the need for the traditional 7249-nucleotide M13mp8 genome and hundreds of staples used in DNA origami constructs [3],



DNA nano-tube design on ENSnano without staples overhangs

* The study is supported by the Priority 2030 Federal Academic Leadership Program.

© Z. Hussein, A.A. Eldeeb, D.M. Kolpashchikov, 2024

thus proving its cost-efficiency. Additionally, overhangs were designed as additions to the generated staples to incorporate TNAs designed for cancer gene therapy. The nano-tube's pore allows small-sized nucleic acid cancer markers to enter and interact with the TNAs, ensuring their selective release within cancer cells. This nano-tube holds promise to facilitate gene silencing, offering a powerful method to combat cancer progression.

References

1. Nedorezova D. D. et al. Specificity of oligonucleotide gene therapy (OGT) agents // Theranostics. 2022. Vol. 12, No. 16. P. 7132–7157.

2. Patra C., Eldeeb A. A. Thresholding DNA Nanomachine as a Highly Cooperative and Efficient Enzyme-Like System for Controlled RNA Cleavage // ChemMedChem. 2023. Vol. 18, No. 7.

3. Rothemund P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns // Nature. 2006. Vol. 440, No. 7082. P. 297–302.

4. Ghosal S., Bag S., Bhowmik S. Unravelling the Drug Encapsulation Ability of Functional DNA Origami Nanostructures: Current Understanding and Future Prospects on Targeted Drug Delivery // Polymers. 2023. Vol. 15, No. 8. P. 1850.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-211

DEVELOPMENT OF THE PEPTIDE HUMAN INSULIN-DEGRADING ENZYME INHIBITOR JURA AND ANALYSIS OF ITS INHIBITORY ACTIVITY *

A. V. Merkuryev[1], N. A. Grudinina[2], Y. P. Garmai[3],
G. F. Arzamastsev[1,3], Y. A. Zabrodskaya[1,4], V. V. Egorov[2,4]

[1] *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University*
[2] *Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg*
[3] *Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov, National Research Centre "Kurchatov Institute"*
[4] *Smorodintsev Research Institute of Influenza, WHO National Influenza Centre of Russia, Saint Petersburg*

✉ merkurev.2001@mail.ru

Abstract

Based on molecular dynamics modeling, a novel peptide human insulin-degrading enzyme (IDE) inhibitor **Jura** is proposed. Its primary structure matches with IDE sequence region. It has been demonstrated that **Jura** peptide has the activity to inhibit IDE through a competitive mechanism with an inhibition constant of about 10 nM. The possibility of using the **Jura** peptide for the treatment of type II diabetes and a number of neurodegenerative diseases is being discussed.

Insulin-degrading enzyme (IDE, EC 3.4.24.56) — a secreted protein with the specific proteolytic activity of insulin, other protein and peptide substrates (beta-amyloid peptide, glucagon, amylin and calcitonin) [1]. Its ability to cleave polypeptides in amyloid-like fibrils is associated with the molecular mechanisms of the development of Alzheimer's disease [2] and type II diabetes [3]. Peptide IDE inhibitors can potentially be used in the treatment of type II diabetes [4] and a number of neurodegenerative diseases [5].

Based on the results of the molecular dynamics modeling of the enzyme structure evolution, a potentially inhibitory peptide **Jura** was proposed, which sequence matches with IDE 995-1009 amino acids residues. The inhibitory activity of **Jura** against the reaction of IDE with a fluorogenic substrate was assessed. A decrease in the rate of hydrolysis of the fluorogenic substrate IDE was observed *in vitro* in the presence of **Jura**. In order to determine the mechanism of **Jura** + IDE interaction, kinetic graphs were plotted in Dixon coordinates 1/V([I]). It has been shown that **Jura** is an effective competitive inhibitor of IDE, with an inhibition constant K_I = 50 nM. The products of the enzymatic reaction **Jura** + IDE and insulin + IDE, as well as dissolved **Jura**, were analyzed by mass spectrometry method. It has been observed that **Jura** undergoes proteolysis at three positions after interaction with IDE.

References

1. Farris W. et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003. Vol. 100, No. 7. P. 4162–4167.

2. Kurochkin V., Goto S. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme // FEBS Lett. 1994. Vol. 345, No. 1. P. 33–37.

3. Farris W. et al. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid beta-protein // Am. J. Pathol. 2004. Vol. 164, No. 4. P. 1425–1434.

4. Maianti J. P. et al. Anti-diabetic activity of insulin-degrading enzyme inhibitors mediated by multiple hormones // Nature. 2014. Vol. 511, No. 7507. P. 94–98.

5. Methods of treating autoimmune diseases of the central nervous system (CNS) and neurodegenerative diseases. Patent EP2600885A2.

* The work was carried out within the framework of the State. Assignments of the Federal State Budgetary Scientific Institution IEM Research: FGWG-2022-0009 (reg. No. NIOKTR-122020300191-9) "Study of the molecular mechanisms underlying the development of multifactorial and hereditary socially significant human diseases" and with partial financial support from the Kurchatov Genome Center — PNPI within the framework of the program for the development of world-class genetic research centers, agreement No. 075-15-2019-1663.

© A. V. Merkuryev, N. A. Grudinina, Y. P. Garmai, G. F. Arzamastsev, Y. A. Zabrodskaya, V. V. Egorov, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-212

OPTIMIZING SELECTED APTAMERS FOR BINDING TO BOVINE SERUM ALBUMIN: ENHANCING AFFINITY AND STABILITY*

A. Nbeaa[1], M. A. Y. Nour[1], A. A. Eldeeb[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*

✉ nbeaa@scamt-itmo.ru

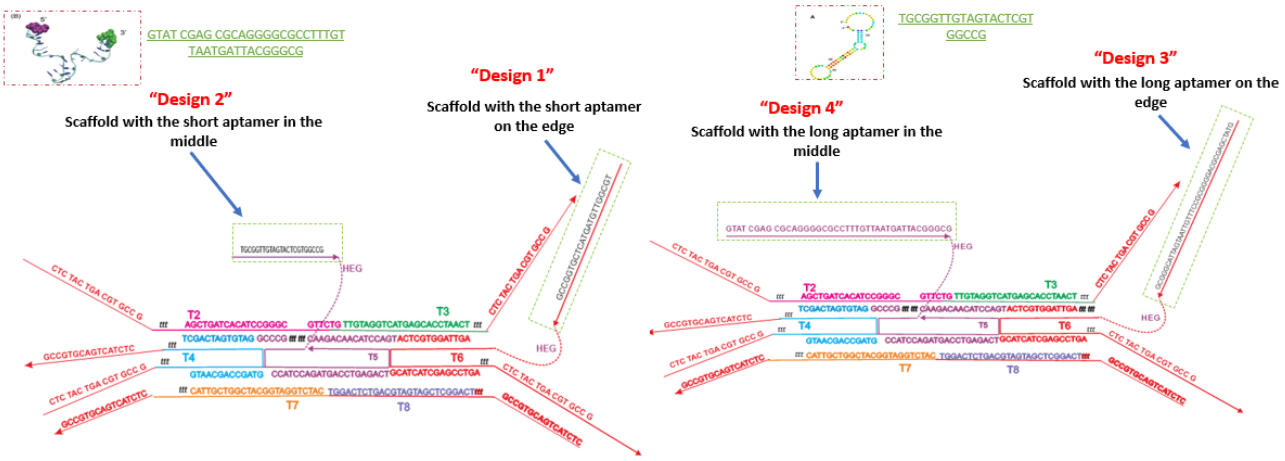
Abstract

Aptamers have been recently paying significant attention to advanced platforms for in vivo detection and targeting for drug delivery due to their unique characteristics. The advantages in aptamers make these molecules bind with high specificity and efficiency to several targets: proteins, cells, and small molecules. The ability of ease synthesis and modification at low cost in laboratories makes them versatile tools for diagnostic applications and targeted therapy.

Aptamers are short synthetic nucleic acids, single-stranded DNA or RNA, that fold into three-dimensional structure for target binding. They are selected through the Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) which involve multiple rounds of incubation, partitioning and amplification [1].

The obtained aptamer following the SELEX procedure have mainly a dissociation constant (Kd) ranging from micromolar to nanomolar and from literature some of them can goes as low as picomolar. Their importance comes from their ability to be used directly in vivo application, unlike antibodies that are recognized by the immune system [2, 3].

A major issue with aptamers is their high k-off, meaning that the complexes they form with their targets are often unstable and quickly fall apart. This instability makes the aptamers which currently used in research ineffective for in vivo applications.



Design of aptamers attached to protective Scaffolds for BSA protein binding

In our work, we aim to enable aptamers to function effectively on cells line models. But before that, we have started working with BSA (bovine serum albumin) as a first step to see if the affinity of our aptamers (already selected ones for BSA binding) will be improved or not after covering these aptamers with a protective scaffold, which will provide the appropriate conditions to have specific three-dimensional structure, reducing their disassociation constant. This makes our approach promising for drug delivery and gene therapy, particularly as a superior alternative to traditional delivery systems like liposomes [4–7].

* The study is supported by the Priority 2030 Federal Academic Leadership Program.

© A. Nbeaa, M. A. Y. Nour, A. A. Eldeeb, D. M. Kolpashchikov, 2024

References

1. Kuntip N., Japrung D., Pongprayoon P. How human serum albumin-selective DNA aptamer binds to bovine and canine serum albumins // Biopolymers. 2021. Vol. 112 (3).

2. Wang C., Du X., Xie T., Li H. Label- and modification-free-based in situ selection of bovine serum albumin specific aptamer // Journal of Separation Science. 2019. Vol. 42 (23). P. 3571–3578.

3. Krämer M., Kissmann A. K., Raber H. F. et al. BSA Hydrogel Beads Functionalized with a Specific Aptamer Library for Capturing Pseudomonas aeruginosa in Serum and Blood // Intern. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22 (20). P. 11118–11118.

4. Cortez C. M., Silva D., Silva C. M. C., Missailidis S. Interactions of aptamers with sera albumins // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2012. Vol. 95. P. 270–275.

5. Ropii B., Bethasari M., Anshori I. et al. The assessment of molecular dynamics results of three-dimensional RNA aptamer structure prediction // PloS One. 2023. Vol. 18 (7). P. e0288684.

6. Oliveira R., Pinho E., Sousa A. L. et al. Modelling aptamers with nucleic acid mimics (NAM): From sequence to three-dimensional docking // PloS One. 2022. Vol. 17 (3). P. e0264701.

7. Sercombe L., Veerati T., Moheimani F. et al. Advances and challenges of liposome Assisted Drug Delivery // Frontiers in Pharmacology. 2015. Vol. 6.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-213

BIVALENT ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR INCREASED SELECTIVITY AND EFFICIENCY OF RNA DEGRADATION

V. O. Nnanyereugo[1], M. V. Dubovichenko[1], D. M. Kolpashchikov[2–4], A. A. Eldeeb[1]

[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 Centre for Forensic Science, University of Central Florida, Orlando, USA*

✉ nnanyereugo@scamt-itmo.ru

Abstract

The efficiency of Antisense oligonucleotide (ASO) technology in vivo is limited by the affinity of relatively short (15–30 nucleotides) ASO that may fail to bind RNA folded in stable secondary structure. We present a design, having two short sequences, that bind RNA targets across an extended region of their folded structures, increasing RNA cleavage efficiency and maintaining cleavage specificity.

Multivalent recognition and binding of biological molecules is a natural phenomenon that increases binding stability (avidity) without decreasing the recognition specificity [1]. The advantage of this approach has been underexplored in mRNA recognition by ASOs. ASO technology uses oligonucleotides that bind to targeted RNA via Watson-Crick base pairing, causing RNase-H dependent degradation and suppressing its biological function. Despite their potential as therapeutic agents, ASOs face challenges in selectivity and efficiency which limits their clinical application [2].

Longer ASO sequences can address the problem of short ASOs that may fail to bind RNA folded in stable secondary structure, but it compromises specificity of RNA binding. To address the specificity problem resulting from using longer ASO sequences, three bivalent variants were designed and analyzed. BivASO; with longer sequences binding to RNA conventionally, BivASO(cis); with short ASO sequences binding RNA conventionally, and BivASO(trans) with short ASO sequences binding to RNA across a region of its folded secondary structure (Fig. 1B). We hypothesize that hybridization of bivalent ASO with shorter sequences to RNA across a region of its folded structure (trans BivASO) provides efficient and specific RNA cleavage in comparison to ASOs with conventional design.

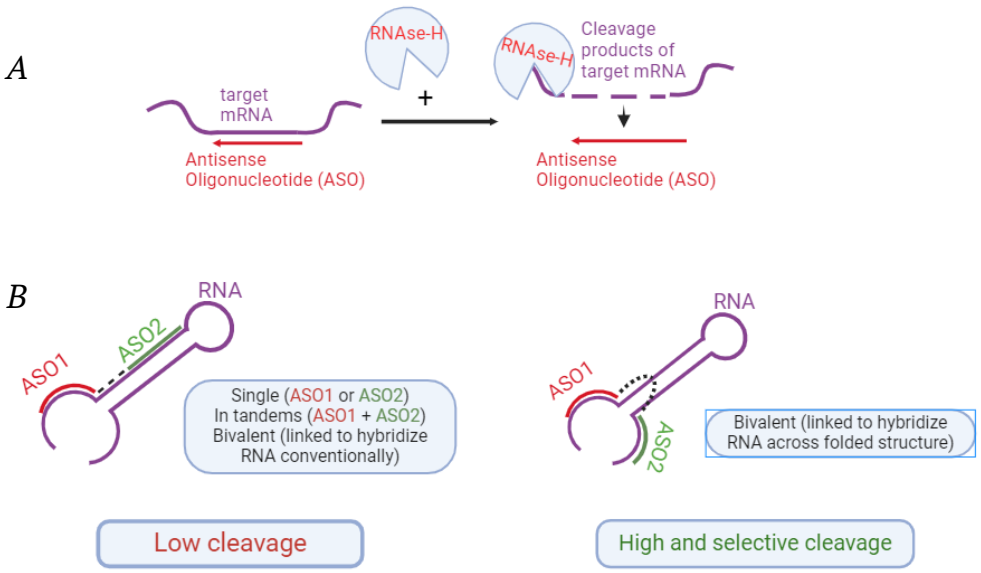


Fig. 1. Showing (*A*) principle of the conventional ASO technology; (*B*) Benefit of the Bivalent ASO trans variant as compared to single ASOs or tandems

© V. O. Nnanyereugo, M. V. Dubovichenko, D. M. Kolpashchikov, A. A. Eldeeb, 2024

Single oligonucleotide sequences and bivalent ASOs were made to target the sequence of RNA-58, a fragment of strA gene, coding the protein responsible for streptomycin resistance [3]. RNA-58 had folding energy of −24.50 kcal/mol [4]. RNA 58 was incubated with each ASO, individually and in tandems, to cooperatively and independently bind to RNA-58 and trigger RNase H dependent cleavage. Apart from BivASO cis, the multivalent association generally showed improved cleavage efficiency when compared to their usage individually or in tandems. BivASO and BivASO(trans) demonstrated approximately 50 and 31% cleavage efficiency, respectively (Fig. 2). This difference can be attributed to the longer target binding sequence of BivASO, which enables tighter binding. The variants were further analyzed incorporating mismatched bases in the sequence design. The BivASO(trans) demonstrated better specificity as compared to the other two variants. This difference can be attributed to the shorter arms of the trans version as longer nucleotide sequences are more tolerant to mismatches.

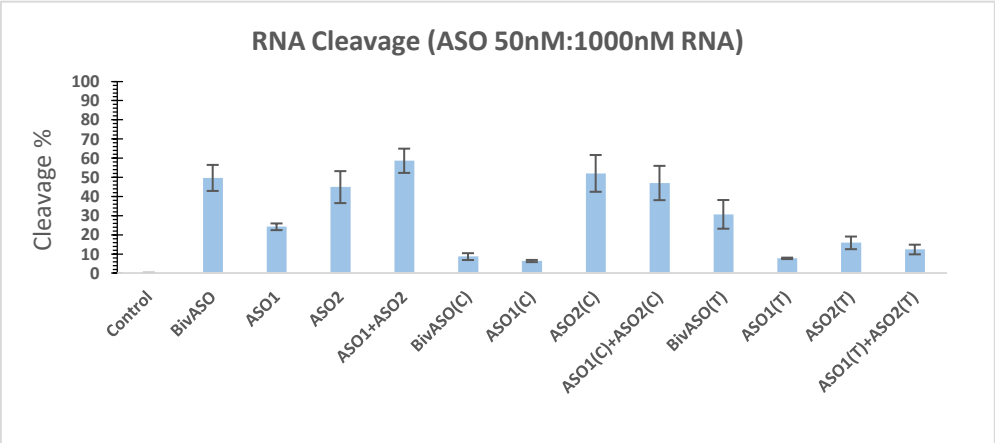


Fig. 2. Graph showing RNase H dependent RNA cleavage in the presence of various ASO agents at 37 °C for 20 minutes. Buffer solution (1 mM MgCl2+, 20 mM NaCl, 50 mM HEPES, and 150 mM KCl). 20 % Urea PAGE at 80V for 150 minutes. The Data are averaged from three independent measurements. Error bars represent 3 standard deviations from the average

In conclusion, improved efficiency from the trans variant shows great prospect in overcoming the low efficacy and selectivity associated with the use of ASOs in clinical applications.

References

1. Dubovichenko M. V. et al. Multivalent DNAzyme agents for cleaving folded RNA // Nucleic Acids Res. 2024. Vol. 52, No. 10. P. 5866–5879.

2. Drozd V. S. et al. Binary Antisense Oligonucleotide Agent for Cancer Marker-Dependent Degradation of Targeted RNA // Nucleic Acid Ther., 2022. Vol. 32, No. 5. P. 412–420.

3. Sundin G. W and Bender C. L. Dissemination of the strA-strB streptomycin-resistance genes among commensal and pathogenic bacteria from humans, animals, and plants // Mol. Ecol. 1996. Vol. 5, No. 1. P. 133–143.

4. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31, No. 13.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-214

CONNECTIVITY MAP-BASED DRUG REPURPOSING OF SP600125 TO TARGET MESENCHYMAL TRANSITION IN GLIOBLASTOMA*

K. V. Odarenko, M. A. Markov, M. A. Zenkova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

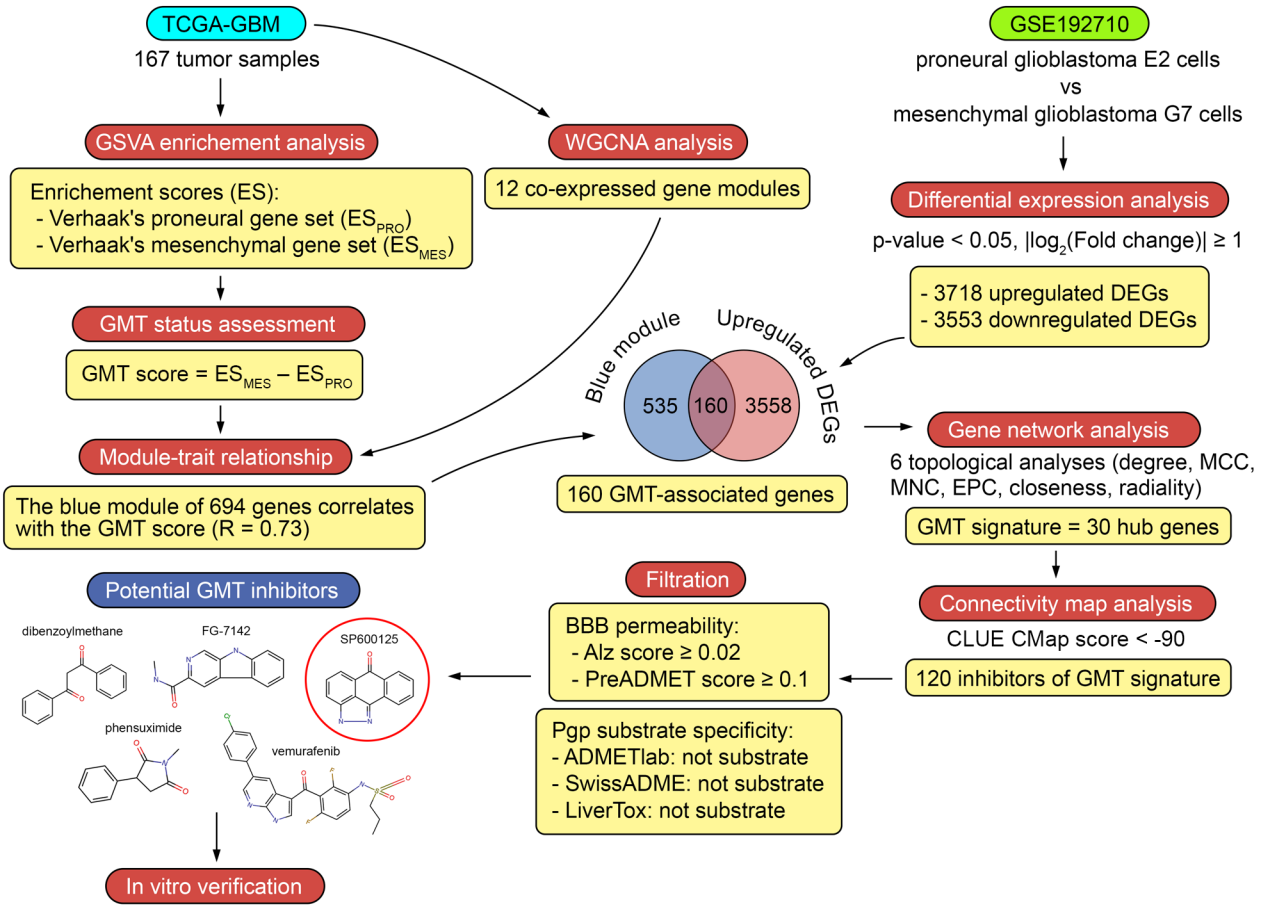
✉ k.odarenko@yandex.ru

Abstract

Two RNA-seq datasets were reanalyzed using pathway and network analysis. Using connectivity map analysis and chemoinformatics, five small molecules were predicted to cross the blood-brain barrier and inhibit glial-mesenchymal transition (GMT), including SP600125, dibenzoylmethane, FG-7142, vemurafenib, and phensuximide. SP600125 was shown to inhibit GMT in U87 glioblastoma cells *in vitro*.

Despite improvements in surgical, radiation, and chemotherapy treatments, the median survival time for patients with glioblastoma remains at 15 months. Given the urgent need for novel therapeutic options against glioblastoma, drug repurposing may offer a relatively short timeframe to provide new drug candidates. The use of approved or investigational drugs allows rapid advancement of clinical studies due to the established pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicity profiles of these agents, which also helps reduce development costs.

Here we introduce a drug repurposing study that employs connectivity map analysis, which compares the transcriptomic signature of a disease with the signatures of cells treated with various small molecules (see Figure). First,



The pipeline for bioinformatics analysis

* The study is supported by RSF (project #23-14-00374).

© K. V. Odarenko, A. V. Markov, M. A. Zenkova, 2024

we established a signature involved in glial-mesenchymal transition (GMT), which drives invasion and drug resistance of glioblastoma cells. Using gene set variation analysis (GSVA), enrichment scores for mesenchymal and proneural gene sets (ES_{MES} and ES_{PRO}, respectively) were calculated and then GMT score was estimated for each tumor sample in TCGA-GBM dataset using the formula: GMT score = ES_{MES} — ES_{PRO}. Subsequently, weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was conducted to identify co-expressed gene modules and a module, named blue, was found to have a positive correlation with GMT score (R = 0.73). Intersection of blue module with genes upregulated during GMT in GSE192710 dataset (p-value < 0.05, $|\log_2 FC| \geqslant 1$) resulted in 160 genes, which were used to construct gene network using STRING plugin in Cytoscape platform. A topological analysis of the gene network was conducted using six criteria of centrality (degree, MCC, MNC, EPC, closeness, and radiality) to identify 30 hub genes. These hub genes were utilized as a GMT signature in a connectivity map analysis on the CLUE platform, which yielded 120 small compounds capable of inhibiting the hub genes. A major challenge in glioblastoma therapy is drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). The permeability of the BBB is highly dependent on P-glycoprotein (Pgp), which reverses the transport of various chemotherapeutic agents. We used two chemoinformatics platforms, Alz and PreADMET, to identify 12 small molecules out of 120 that have the potential to cross the BBB. Five compounds, namely SP600125, dibenzoylmethane, FG-7142, vemurafenib, and phensuximide, were then identified as Pgp non-substrates using the ADMETlab, SwissADME, and LiverTox platforms. Previous studies support the potential of these compounds as anti-glioblastoma agents. The antimelanoma drug vemurafenib improves therapy outcomes in $BRAF^{V600}$-mutant gliomas. FG-7142 and phensuximide are drugs that act on the central nervous system, which may facilitate their delivery to the tumor. Dibenzoylmethane has antitumor effects that have not been studied in glioblastoma. SP600125 is a JNK-specific inhibitor used for research purposes, but is also being actively studied as an antitumor candidate in preclinical studies.

Previously, SP600125 was shown to inhibit proliferation, invasiveness, and stemness of glioblastoma cells. However, its effect on GMT is not well understood. In our experiments, SP600125 caused 50% growth inhibition in glioblastoma cell lines U87, U118, and EPNT-5 at concentrations of 7.3 μM, 36.8 μM, and 35.8 μM, respectively. The basal level of invasiveness of U87 cells was also decreased. A trypsin treatment test demonstrated that cell-cell adhesion increased 2-fold after 48-hour incubation with 60 nM and 125 nM SP600125. Scratch assay showed that 30 min incubation with 20 μM SP600125 reduced cell motility by 37% and 47% at 24 h and 48 h, respectively. Finally, SP600125 was shown to suppress GMT. Preincubation with SP600125 blocked morphological changes in U87 cells induced by two GMT inducers, transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) and cobalt chloride. SP600125 inhibited transwell migration, vasculogenic mimicry, mRNA levels of Slug and fibronectin, and protein levels of N-cadherin in TGF-β1-induced U87 cells.

In conclusion, our analysis demonstrated that SP600125, dibenzoylmethane, FG-7142, vemurafenib, and phensuximide are promising GMT inhibitors that can be used in combination regimens for the treatment of glioblastoma. GMT inhibitory potential of SP600125 was verified on cell models.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-215

ENGINEERING OF ADENOVIRAL VECTOR CARRYING THE GENE OF HUMAN LACTOFERRICIN

V. S. Ugriumov[1,2], R. Z. Prusakov[1,2], V. M. Vakhtinskii[2], K. A. Pervoykina[2]

[1]*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow*
[2]*Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow*

✉ slavapok2@mail.ru

Abstract

Antimicrobial peptides are one of the alternatives to antibiotics, but their widespread use as therapeutic agents is limited by a short half-life and by the toxicity that occurs when large doses are injected. Adenoviral vectors carrying antimicrobial peptide genes help circumvent these limitations. In this work we obtain a recombinant adenovirus carrying the gene of human lactoferricin.

Introduction

According to the statistical data, provided by WHO, in 2019, more than 1.27 million deaths were attributable to antibiotic-resistant bacteria, with an additional estimated 5 million associated deaths [1]. In 2024 WHO released an updated version of Bacterial Priority Pathogens List (BPPL). Among them, a significant role belongs to gram-positive antibiotic-resistant bacteria such as *S. aureus*, *E. faecium*, and different species of *Streptococci* [1].

Antimicrobial peptides are a promising tool for combating antibiotic-resistant strains of pathogens. Most of the well-studied AMP have an amphipathic alpha-helical structure with a cationic and hydrophobic surface that helps them interact with the bacterial membrane disrupting it. The development of resistance to AMP in bacteria is hampered by the fact that modification of membranes to counteract AMP can cause functional changes unfavorable to the vital activity of the bacteria themselves.

Among numerous known AMP, we chose human Lactoferricin, as one of the most studied and safe. Lactoferricin interacts with the outer bacterial membrane, and causes its destruction, as well as penetrates into bacterial cells and affects bacterial intracellular mechanisms that leads to consequent cell death [2]. Widespread use of AMP is limited due to a number of problems. The first problem is the short half-life because peptides are rapidly degraded *in vivo* by the action of proteases. The second problem is related to their toxicity to normal cells when a large dose of the drug is administered.

One of the possible solutions is the use of viral vectors. Prolonged *in vivo* expression of desired AMP at a certain level provides almost its constant concentration, which is enough for effective therapy. The aim of our work was to construct an adenoviral vector, carrying the gene of human Lactoferricin.

Results

During the first step of our work we obtained a pShuttle-CMV plasmid (Agilent #240007) carrying the gene of human lactoferricin using the circular PCR. We used the primers, having the gene of lactoferricin in their 5` extensions and the region of their complementarity to each other (Fig. 1) Sequencing of the expression cassette showed the correct insertion of gene.

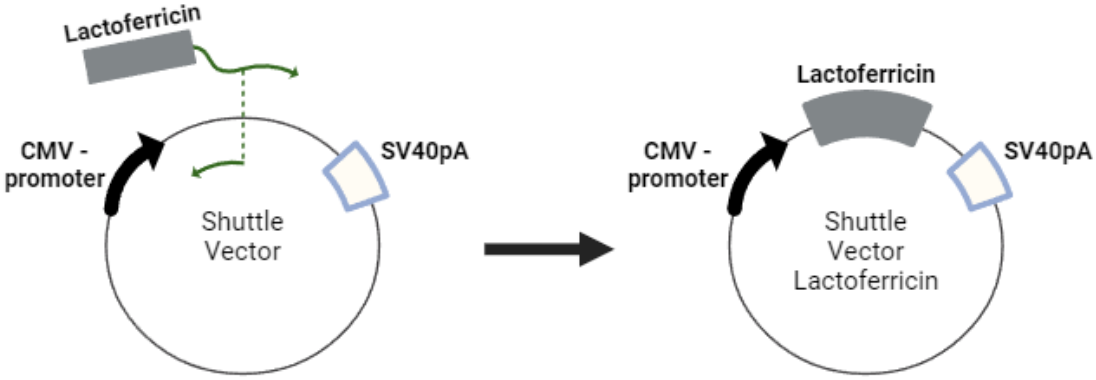


Fig. 1. Scheme of circular PCR using the primers, carrying the gene of Lactoferricin in the extensions

© V. S. Ugriumov, R. Z. Prusakov, V. M. Vakhtinskii, K. A. Pervoykina, 2024

On the next step we linearized pShuttle-CMV-Lactoferricin using PmeI and co-transformed BJ5183 strain of *E. coli* (Agilent #200154) with pAdEasy-1 vector (Agilent 240005), containing the genome of human Ad5 virus. Consequential selection positive recombinants (pAd-lactoferricin) were held by addition of Kanamycin to the medium.

After that we transfected HEK-293 cell line (ATCC) with previously PacI-linearized pAd-lactoferricin, using the Lipofectamine® 2000 Reagent (TM 11668-027). Every 3 days we replaced conditioned medium with fresh DMEM 10% FBS until we saw a CPE. Infected cells were harvested and frozen thawed three times. Virus stock was subcloned through a single plaque. Recombinant viruses were tested for presence of Ad5-Hexon and lactoferricin genes as well as the absence of E1 region of wild type adenovirus (Fig. 2).

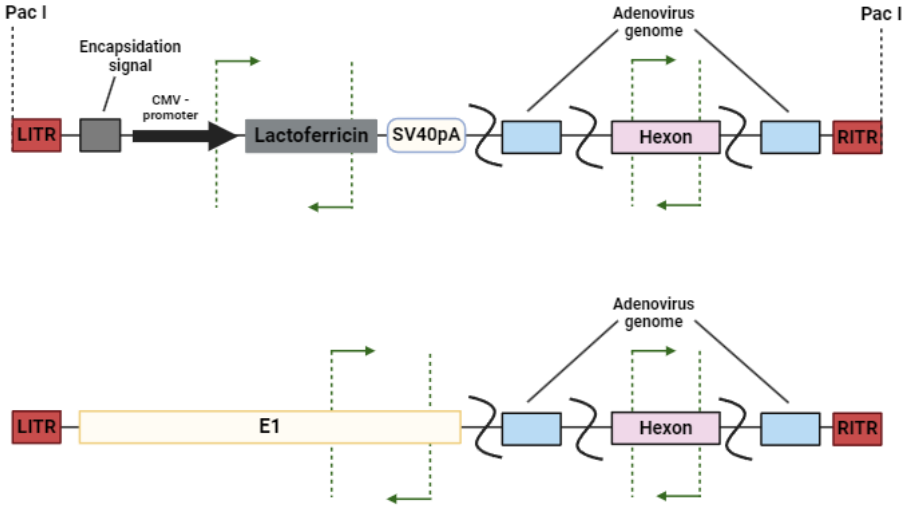


Fig. 2. Comparison of recombinant and wild types of Ad5

The results of PCR analysis provided at Fig. 3.

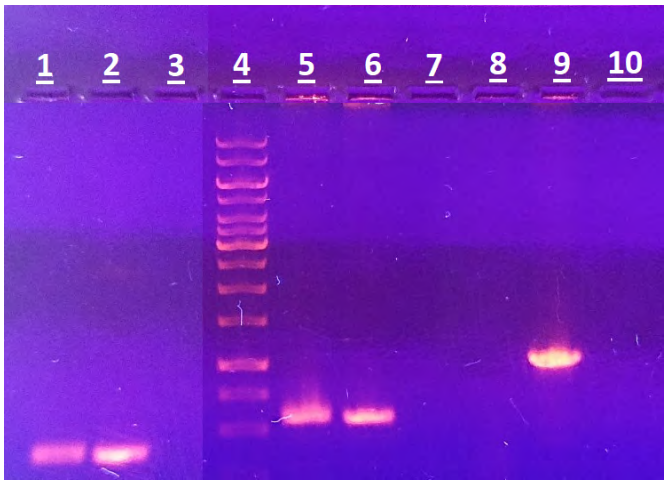


Fig. 3. Visualization of the results of PCR analysis using electrophoresis in 0.8% agarose gel.
Lanes *1–3*: PCR analysis for the presence of the lactoferricin gene. *1* — Infected cells, *2* — Positive control, *3* — Negative control; *4* — GeneRuler 1kb DNA Ladder (SM0311). Lanes *5–7*: PCR analysis for the presence of the adenovirus hexone gene, *5* — Infected cells, *6* — Positive control, *7* — Negative control; Lanes *8–10*: PCR analysis for the presence of the E1 region. *8* — Infected cells, *9* — Positive control, *10* — Negative control

The results of PCR show that the obtained virus is recombinant replicative deficient human adenovirus 5 serotype, carrying the gene of lactoferricin under the control of CMV promoter.

Our next step is to confirm the expression of lactoferricin by our vector and to study its antibacterial effect on Gram-positive strains of *in vitro* and *in vivo*.

References

1. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance // World Health Organization. URL: https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461 (access date: 20.06.2024).

2. Gruden Š., Poklar U. N. Diverse mechanisms of antimicrobial activities of lactoferrins, lactoferricins, and other lactoferrin-derived peptides // Intern. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, No. 20. P. 11264.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-216

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *COXIELLA BURNETII* МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГЕНА 16S РРНК

IDENTIFICATION OF *COXIELLA BURNETII* USING SEQUENCING AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE 16S RRNA GENE

М. Р. Абаева, А. У. Исабек, А. М. Мелисбек, А. К. Бопи, Г. О. Шыныбекова, Н. С. Кожабергенов, М. Д. Алмежанова, К. Т. Султанкулова

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан, пгт Гвардейский

M. R. Abaeva, A. U. Isabek, A. M. Melisbek, A. K. Bopi, G. O. Shynybekova, N. S. Kozhabergenov, M. D. Almezhanova, K. T. Sultankulova

Research Institute for Biological Safety Problems, Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan, Gvardeysky

✉ Madik5897@mail.ru

Аннотация

Ген 16S рРНК несет как консервативные, так и вариабельные участки нуклеотидной последовательности, что позволяет использовать его как для определения рода, так и для видового типирования микроорганизмов. С использованием метода секвенирования и филогенетического анализа гена 16S рРНК идентифицирован *Coxiella burnetii*, присутствующий в организме клеща из Туркестанской области Республики Казахстан. Результаты филогенетического анализа по гену 16S рРНК показали, что в образце, выделенном из клеща из Туркестанской области в 2023 г., присутствует возбудитель Ку лихорадки *Coxiella burnetii*. При молекулярном типировании изолята *Coxiella burnetii* обнаружен тип MST 6.

Abstract

The 16S rRNA gene carries both conservative and variable regions of the nucleotide sequence, which allows it to be used for both genus and species typing of microorganisms. Using the sequencing method and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *Coxiella burnetii* was identified in the body of a tick from the Turkestan region of the Republic of Kazakhstan. The results of the phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene showed that the causative agent of Q fever *Coxiella burnetii* was present in the sample isolated from a tick from the Turkestan region in 2023. Molecular typing of the *Coxiella burnetii* isolate revealed the MST 6 type.

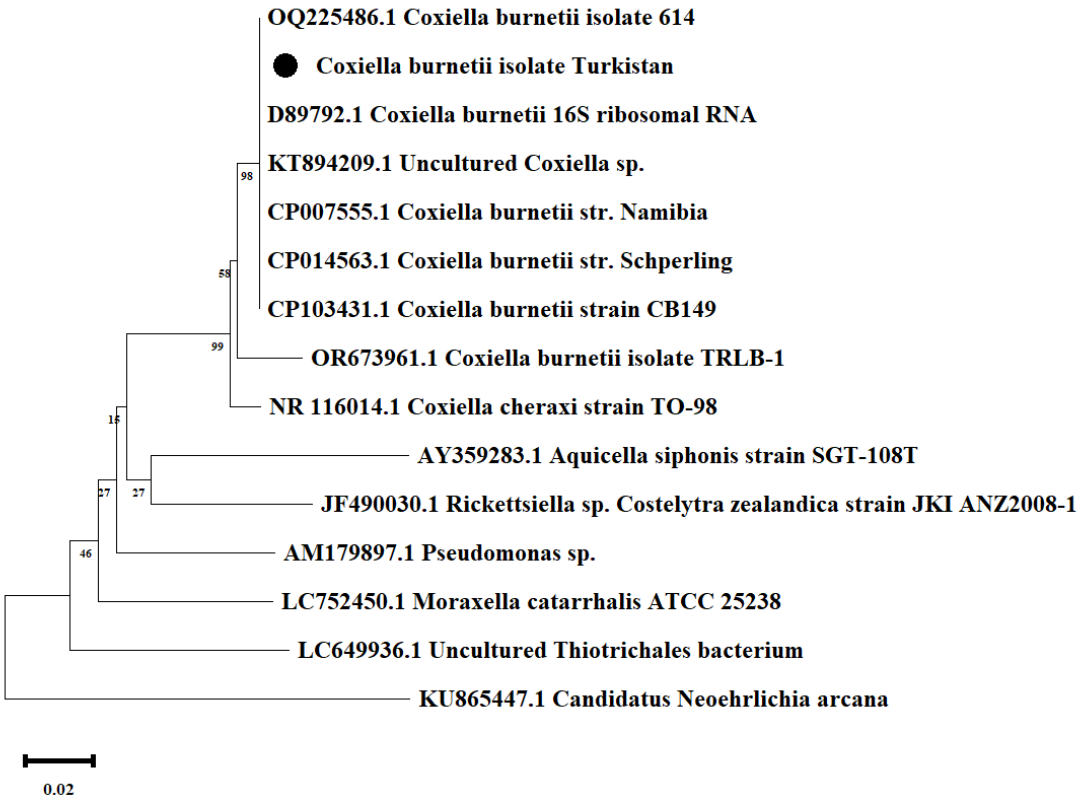
Лихорадка Ку (коксиеллез) — вызываемая *Coxiella burnetii* зоонозная инфекция с длительным и самостоятельным существованием очагов сельскохозяйственных животных, наличием на отдельных территориях смешанных природно-хозяйственных (антропургических) очагов. В природных очагах резервуаром *C. burnetii* являются дикие мелкие млекопитающие, иксодовые и аргасовые клещи. В антропургических очагах — сельскохозяйственные животные, среди которых основным источником возбудителя является мелкий и крупный рогатый скот.

В этом исследовании проанализирован изолят *Coxiella burnetii*, выделенный из клещей из Туркестанской области Республики Казахстан, путем определения последовательностей 16S рРНК и филогенетического анализа.

Известно, что все бактериальные рРНК локусы содержат гены 16S РНК. Эти гены обладают изменчивостью на уровне родов и видов. Определение типовой принадлежности проводили на основе секвенирования и филогенетического анализа гена 16S рибосомальной РНК. Для этого проводили наработку ПЦР продуктов гена 16S рРНК с использованием пар праймеров QF (5'-ATTGAAGAGTTTGATTCTGG-3') и QR (5'-CGGCCTCCCGAAGGTTAG-3'), размер получаемого продукта составил 1457 п. о.

На рисунке представлены данные филогенетического древа по гену 16S рРНК, который построен по компьютерной программе Mega 11 методом Neigbor-Joining. Для проведения сравнительного анализа были взяты штаммы из международной базы данных GenBank. Изолят *Coxiella burnetii*, выделенный из клещей из Туркестанской области, образовал одну клональную группу по гену 16S рРНК со штаммом CB149 (CP103431.1), относящимся к шестому генотипу (MST 6).

© М. Р. Абаева, А. У. Исабек, А. М. Мелисбек, А. К. Бопи, Г. О. Шыныбекова, Н. С. Кожабергенов, М. Д. Алмежанова, К. Т. Султанкулова, 2024



Филогенетическое древо, основанное на нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК *C. burnetii*

При проведении сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК было определено, что идентичность казахстанского изолята *C. burnetii*, выделенного из клеща и доставленного из Туркестанской области, и азиатских и африканских штаммов (CP014563 *Coxiella burnetii* str. Schperling из Кыргызстана, OQ225486.1 Coxiella burnetii isolate 614 штамм из России, CP007555 *Coxiella burnetii* str. Namibia из Намибии и CP103431 *Coxiella burnetii* strain CB149 из Сенегала) из базы данных GenBank составляет 99–99,93 %.

Результаты исследований по определению молекулярно-генетических особенностей казахстанского изолята *Coxiella burnetii*, выделенного из клеща и доставленного из Туркестанской области, использованы для решения задач генетической паспортизации возбудителя Ку лихорадки *Coxiella burnetii*.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-217

УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ TCR *

ADVANCED CANCER IMMUNOTHERAPY: HARNESSING SINGLE-CELL SEQUENCING TO DISCOVER NATURALLY-OCCURRING ANTIGEN-SPECIFIC TCRS

С. Алрхмун[1,2], М. С. Фишер[1], Ю. А. Лопатникова[1], О. Ю. Перик-Заводская[1], М. О. Волынец[1], Р. Ю. Перик-Заводский[1], Ю. А. Шевченко[1], К. В. Назаров[1], Ю. Г. Филиппова[1], А. Алсаллум[1], В. В. Курилин[1], А. Н. Силков[1], С. В. Сенников[1,3]

[1]*НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск*
[2]*Факультет естественных наук, Новосибирский государственный университет*
[3]*Институт медицины и медицинских технологий, Новосибирский государственный университет*

S. Alrhmoun[1,2], M. S. Fisher[1], J. A. Lopatnikova[1], O. Y. Perik-Zavodskaia[1], M. O. Volynets[1], R. Y. Perik-Zavodskii[1], J. A. Shevchenko[1], K. V. Nazarov[1], J. G. Philippova[1], A. Alsalloum[1], V. V. Kurilin[1], A. N. Silkov[1], S. V. Sennikov[1,3]

[1]*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk*
[2]*Faculty of Natural Sciences, Novosibirsk State University*
[3]*Institute of Medicine and Medical Technologies, Novosibirsk State University*

✉ saleh.alrhmoun1@gmail.com

Аннотация

Адаптивная клеточная терапия, в частности Т-клеточная терапия (TCR-T), представляет собой передовую стратегию лечения солидных опухолей [1]. Современные методы разработки TCR-T-клеточной терапии позволяют получить ограниченное количество кандидатов TCR [2], что ограничивает полное представление репертуара и затрудняет идентификацию наиболее эффективных TCR. Это подчеркивает необходимость разработки новых методов разработки TCR-T-клеточной терапии.

Abstract

Adoptive cell therapy, particularly T cell receptor–engineered T (TCR-T) cell therapy, represents a cutting-edge and promising strategy for treating solid tumors [1]. Current methods for developing TCR-T cell therapies yield a limited number of candidate TCRs [2], missing the comprehensive view of the repertoire, which may impede the identification of the most effective TCRs. This limitation highlights the need for new techniques in TCR-T cell therapy development.

Цель — разработать новый подход к обнаружению и анализу всего репертуара природных антигенспецифических TCR с целью выявления наиболее эффективных TCR для применения в TCR-T-клеточной терапии.

Материалы и методы. Дендритные клетки условно здоровых доноров были нагружены иммуногенными пептидами интересующего антигена для получения антигенспецифичных CD8+ Т-лимфоцитов из периферической крови. Впоследствии весь репертуар природных полноразмерных антигенспецифических TCR был проанализирован с помощью секвенирования мРНК единичных клеток. Этот анализ включал оценку доминантности клонотипов, иммунного транскриптома и вероятности связывания с комплексом пептид/MHC с использованием инструмента TCRscape [3] и нейронной сети ERGO-II [4]. Эти анализы были направлены на выявление наиболее эффективных TCR-кандидатов для разработки TCR-T-клеточной терапии. В конце были получены TCR-T-клетки, экспрессирующие TCR-кандидат, и проведена оценка их функциональности и селективности.

Полученные FASTQ файлы были обработаны с помощью BD pipeline версии 1.12 для получения финальных матриц экспрессии генов. Затем мы запустили инструмент ERGO-II, выбрав входной файл и базу данных (McPAS-TCR) [5]. ERGO-II требует информации о последовательностях TCR CDR3a и CDR3β, пептидной последовательности, типе MHC, генах V и J и типе Т-клеток. Выходной файл содержал прогнозируемые вероятности связывания TCR с комплексом пептид/MHC, которые варьировалось от 0 до 1.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 21-65-00004).

© С. Алрхмун, М. С. Фишер, Ю. А. Лопатникова, О. Ю. Перик-Заводская, М. О. Волынец, Р. Ю. Перик-Заводский, Ю. А. Шевченко, К. В. Назаров, Ю. Г. Филиппова, А. Алсаллум, В. В. Курилин, А. Н. Силков, С. В. Сенников, 2024

Затем мы импортировали матрицы экспрессии генов каждого биологического образца, матрицу прогнозируемых вероятностей связывания из ERGO-II, а также матрицу репертуара адаптивных иммунных рецепторов (AIRR) в TCRscape, после чего выполнили нормализацию по log2 CPM (количество на миллион) для объединенной матрицы и подсчитали доминирующие клонотипы TCR, затем мы выполнили анализ главных компонент PCA, чтобы оценить размерность данных, и уменьшение размерности UMAP для совместного внедрения клонотипов, прогнозируемых вероятностей связывания и данных об экспрессии генов. После этого мы сгруппировали клетки с помощью HDBSCAN [6] и нашли доминирующий клонотип, используя прогнозируемые вероятности связывания и количество клеток на клонотип.

Результаты. Разработанный протокол продемонстрировал способность значительно увеличивать процент антигенспецифических Т-клеток, достигая увеличения более чем в 200 раз. Кроме того, с его помощью было успешно идентифицировано более 100 различных антигенспецифических клонотипов TCR. Полученные в результате TCR-T-клетки проявляют высокий уровень цитотоксичности и селективности по отношению к целевому антигену, что подчеркивает их способность предпочтительно воздействовать на опухолевые клетки и уничтожать их.

Выводы. Нами был разработан всесторонний подход к обнаружению и анализу не только нескольких, но и всего репертуара природных антигенспецифичных TCR, что позволяет идентифицировать наиболее эффективный TCR для разработки TCR-T-клеточной терапии. Кроме того, разработанный протокол может быть адаптирован к различным антигенам и вариантам MHC, что делает его универсальным инструментом как для научных исследований, так и для клинических применений.

Литература

1. Wei F., Cheng X. X., Xue J. Z., Xue S. A. Emerging Strategies in TCR-Engineered T Cells // Front. Immunol. 2022. Vol. 13. P. 850358.

2. Scheper W., Kelderman S., Fanchi L. F. et al. Low and variable tumor reactivity of the intratumoral TCR repertoire in human cancers // Nat. Med. 2018. Vol. 25 (1). P. 89–94.

3. Perik-Zavodskii/TCRscape: TCRscape — a tool for simultaneous multimodal gene expression and clonotype analysis of single T-cells profiled via the BD Rhapsody system. URL: https://github.com/Perik-Zavodskii/TCRscape.

4. IdoSpringer/ERGO-II: ERGO-II, an updated version of ERGO including more features for TCR-peptide binding prediction. URL: https://github.com/IdoSpringer/ERGO-II.

5. Tickotsky N., Sagiv T., Prilusky J. et al. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences // Bioinformatics. 2017. P. 2924–2929.

6. McInnes L., Healy J., Astels S. hdbscan: Hierarchical density based clustering // J. Open Source Softw. 2017. Vol. 2. P. 205.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-218

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *MAOA* (RS1137070) У ПОДРОСТКОВ С ПРОБЛЕМНЫМ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНЫХ ВИДЕОИГР *

POLYMORPHISM OF THE *MAOA* GENE (RS1137070) IN ADOLESCENTS WITH PROBLEMATIC USE OF COMPUTER VIDEO GAMES

К. В. Афоничева, И. В. Марченко, М. В. Смольникова

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

K. V. Afonicheva, I. V. Marchenko, M. V. Smolnikova

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

✉ smarinv@yandex.ru

Аннотация

Нарушение метаболизма нейромедиаторов потенциально обуславливает формирование проблемного использования компьютерных видеоигр (PVGU) среди подростков. Проведено исследование вариантов гена *MAOA*, катализирующего распад нейротрансмиттеров, у русских подростков. Получены данные о распределении частот генотипов и аллелей полиморфизма rs1137070 гена *MAOA* среди подростков с признаками PVGU и без них.

Abstract

Impaired neurotransmitter metabolism potentially contributes to problematic video game use (PVGU) among adolescents. A study was conducted of variants of the *MAOA*, which catalyzes the breakdown of neurotransmitters, in Russian adolescents. Data of the frequency distribution of genotypes and alleles of the rs1137070 polymorphism of the *MAOA* gene among adolescents with and without signs of PVGU were obtained.

Проблемное использование компьютерных видеоигр становится все более распространенным явлением в современном обществе [1]. PVGU имеет мультифакториальную природу, в связи с чем изучение генов нейромедиаторов, вовлеченных в патогенез аддитивного поведения, является актуальным. К настоящему времени конкретные гены, принимающее участие в патогенезе PVGU, не идентифицированы, однако изучаются кандидатные гены. Одним из таких является ген моноаминооксидазы А (*MAOA*). Моноаминооксидаза — ключевой фермент метаболизма биоаминов (норадреналина, дофамина, серотонина). Полиморфный ген *MAOA* локализуется на Х-хромосоме в регионе Xp11.23, в связи с чем мужчины не имеют гетерозиготных вариантов мутаций. Полиморфизм rs1137070 данного гена расположен в 8-м экзоне и влияет на активность фермента: аллель С данного полиморфизма ассоциирован с высокой активностью фермента, что приводит к более интенсивному метаболизму нейротрансмиттеров, что связано с повышенным риском развития табачной и героиновой зависимости [2]. Аллель Т связан с низкой активностью данного фермента, его носители обладают замедленным метаболизмом нейромедиаторов, ввиду чего имеют их высокий уровень, что может быть связано с агрессивным поведением, зависимостью от интернета и онлайн-игр, а также с риском развития шизофрении и депрессии [3]. Целью данной работы было изучение распространенности полиморфизма rs1137070 *MAOA* у подростков с проблемным использованием компьютерных видеоигр.

В исследовании участвовали 303 русских подростка (средний возраст 14,2 года) (национальность соответствовала анкетным данным). Тестирование исследуемой выборки проведено с помощью переводной версии опросника для оценки игровой зависимости Game Addiction Scale for Adolescents (GASA). Определение генотипов и аллелей полиморфизма rs1137070 гена *MAOA* проведено с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Статистическая обработка проведена с помощью критерия $\chi 2$ и p-критерия.

Среди 303 участников исследования у 37 подростков (12,2 %) было выявлено PVGU на основании результатов оценки шкалы GASA. Частота встречаемости генотипов и аллелей не отличалась как в общей группе

* Исследование выполнено в рамках темы государственного задания «Психосоматические расстройства у подростков Центральной Сибири: распространенность, структура, психологические факторы риска и нейрогенетические предикторы», ЕГИСУ № 124020100064-6.

© К. В. Афоничева, И. В. Марченко, М. В. Смольникова, 2024

подростков с признаками PVGU и без них, так и при отдельном сравнении подростков мужского и женского пола. Так, частота встречаемости редкого аллеля T данного полиморфизма в общей выборке подростков с PVGU составила 36,8 %, без — 35,4 % ($p > 0,05$). Носители аллеля T встречаются среди 23,5 % мальчиков с признаками проблемного использования видеоигр и среди 42,5 % девочек ($p > 0,05$).

Данных по распределению изучаемого полиморфизма *MAOA* в литературе нет, наиболее близким аналогом к PVGU является расстройство, связанное с онлайн-играми. В работе Yen et al. [3] показано, что полиморфизм rs1137070 гена *MAOA* ассоциирован с интернет-игровым расстройством (IGD), однако эта связь оказалась зависимой от психологических факторов: враждебность и депрессия значительно усиливали эту ассоциацию у подростков. Кроме этого, взаимодействие между полиморфизмом rs1137070 гена *MAOA* и психологическими факторами имело более выраженный характер влияния на развитие IGD, чем сам полиморфизм гена [3]. Известно, что в патогенез аддитивного поведения и патологических зависимостей, в том числе PVGU, вовлечены сложные взаимодействия нейромедиаторов и их рецепторов, поэтому требуется проведение комплексного анализа ряда генов, кодирующих эти вещества.

Результаты настоящего исследования подчеркивают важность углубленного изучения влияния полиморфизма rs1137070 гена *MAOA* и генов других нейромедиаторов на поведенческие особенности подростков, что может способствовать разработке целенаправленных стратегий профилактики проблемного использования компьютерных видеоигр.

Литература

1. Эверт Л. С., Терещенко С. Ю., Зайцева О. И. и др. Интернет-зависимость у подростков Центральной Сибири: анализ распространенности и структура потребляемого контента // Бюллетень сибирской медицины. 2021. Т. 19, № 4. С. 189–197.

2. Chiang S.-L., Nithiyanantham S., Velmurugan B. K. et al. A haplotype-specific linkage disequilibrium pattern of monoamine oxidase A gene associated with regular smoking in women // Journal of Gene Medicine. 2019. Vol. 21, No. 12. P. e3142.

3. Yen J.-Y., Chou W.-P., Lin H.-C. et al. Roles of Hostility and Depression in the Association between the MAOA Gene Polymorphism and Internet Gaming Disorder // International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021. Vol. 18, No. 13. P. 6910.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-219

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МОДИФИКАЦИЙ МЕЖНУКЛЕОТИДНОГО ФОСФАТА НА СВОЙСТВА СИНТЕЗИРУЕМЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ *

STUDYING THE EFFECT OF DIFFERENT TYPES OF INTER-NUCLEOTIDE PHOSPHATE MODIFICATIONS ON THE PROPERTIES OF SYNTHESISED OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVES

И. А. Бауэр, Т. Д. Жарков, С. А. Жуков, О. А. Коваль,
М. С. Купрюшкин, Е. В. Дмитриенко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

I. A. Bauer, T. D. Zharkov, S. A. Zhukov, O. A. Koval,
M. S. Kupryushkin, E. V. Dmitrienko

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ i.bauer@g.nsu.ru

Аннотация

Данная работа посвящена изучению особенностей самосборки в мицеллоподобные структуры, нековалентных взаимодействий с сывороточным альбумином и клеточного накопления фосфат-модифицированных олигонуклеотидов. На примере представителей классов фосфорилгуанидиновых, сульфониламидофосфатных и триазиниламидофосфатных модификаций была показана возможность создания олигонуклеотидных производных с заранее определенными свойствами.

Abstract

This work is devoted to studying the features of self-assembly into micelle-like structures, noncovalent interactions with serum albumin, and cellular accumulation of phosphate-modified oligonucleotides. By the example of the representatives of phosphoryl guanidine, sulfonyl phosphoramidate and triazinyl phosphoramidate classes of modification, the possibility of creating oligonucleotide derivatives with predetermined properties was shown.

Последние достижения в области генетики и химии нуклеиновых кислот позволили создать принципиально новые терапевтические препараты, избирательно воздействующие на причину заболевания. К преимуществам таких агентов относится высокая селективность связывания с молекулами-мишенями за счет комплементарности азотистых оснований взаимодействующих цепей. Однако, несмотря на достигнутые успехи, остаются нерешенными проблемы улучшения фармакокинетических свойств терапевтических олигонуклеотидов при сохранении их биологической активности. Одним из перспективных подходов является синтез модифицированных олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные остатки для повышения их эффективности проникновения в клетки и улучшения фармакокинетических свойств. Понимание механизмов взаимодействия таких производных с сывороточным альбумином человека, самым распространенным белком плазмы крови, может обеспечить новые возможности и свойства для терапевтических олигонуклеотидов амфифильной природы, такие как повышенная стабильность, снижение иммунного ответа и контролируемое биораспределение.

Целью работы являлось систематическое изучение свойств новых классов олигонуклеотидных производных: триазиниламидофосфатных, фосфорилгуанидиновых и сульфониламидофосфатных, — содержащих на 3’-конце протяженные алкильные цепи. Для достижения цели была синтезирована библиотека фосфат-модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов. На серии 16-звенных олигонуклеотидов сравнивалось влияние группы, через которую вводилась модификация, а также влияние количества и длины алкильных цепей на формирование мицеллоподобных структур и нековалентные взаимодействия с альбумином человека. Для триазиниламидофосфатных производных также оценивалось влияние таких факторов, как длина цепи олигонуклеотида и ее мономерный состав. В ходе работы было показано, что благодаря своим амфифильным свойствам исследуемые олигонуклеотиды способны самособираться в мицеллоподобные структуры, при этом критическая концентрация мицеллообразования не существенно зависит от длины олигонуклеотидной цепи, а увеличение длины углеродной цепи приводит к ее уменьшению. Размер надмолекулярных структур, охарактеризованный методом динамического светорассеяния, составил 8–30 нм. При этом добавление сывороточного

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 21-64-00017).

© И. А. Бауэр, Т. Д. Жарков, С. А. Жуков, О. А. Коваль, М. С. Купрюшкин, Е. В. Дмитриенко, 2024

альбумина приводит к сдвигу пика в сторону уменьшения гидродинамического диаметра, вероятно, вследствие разрушения мицеллоподобной структуры. Методами задержки в геле, а также флуоресцентного титрования показано, что исследуемые олигонуклеотиды образуют стабильные комплексы с сывороточным альбумином человека с константой диссоциации ~10^{-6} М. Исследуемые триазиниламидофосфатные олигонуклеотидные производные и их дуплексы, как по отдельности, так и в комплексах с HSA, способны эффективно проникать в клетки HEK293 и T98G. Показано, что триазиниламидофосфатные производные антисмысловых олигонуклеотидов, нацеленных на мРНК зеленого флуоресцентного белка, проявляют умеренную общую цитотоксичность не более 20 %, а их биологическая активность *in vitro* в подавлении синтеза GFP превышает эффективность нативных олигонуклеотидов.

В настоящей работе представлено изучение особенностей самосборки, формирования нековалентных ассоциатов с HSA, а также проникновения в клетки новых амфифильных производных олигонуклеотидов. Полученные данные, а также уже известные факты, что они обладают повышенной устойчивостью к клеточным нуклеазам и не проявляют значительной цитотоксичности, делают их перспективными кандидатами для биомедицинских разработок.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-220

ОЦЕНКА ВКЛАДА СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА

SIALIC ACIDS CONTRIBUTE TO THE INHIBITION OF ANTITUMOR IMMUNITY

М. Э. Березкина[1,2], Д. О. Чернышова[1], С. А. Нисканен[1], Д. О. Виноходов[2]

[1]АО «Биокад», Санкт-Петербург
[2]Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

M. E. Berezkina[1,2], D. O. Chernyshova[1], S. A. Niskanen[1], D. O. Vinokhodov[2]

[1]Biocad, JSC, Saint Petersburg
[2]Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University)

✉ berezkiname@biocad.ru

Аннотация

В работе изучено влияние поверхностных сиаловых кислот на ингибирование иммунной системы человека. На модельной линии отработаны условия удаления сиаловых кислот с поверхности таргетных клеток. На панели, состоящей из клеточных линий различного происхождения, оценен вклад десиалирования в изменение цитолитической активности NK-клеток и поверхностного содержания маркеров активации Т-клеток.

Abstract

The research shows the effect of surface sialic acids on the human immune system inhibition. Experimental conditions for sialic acids removal from the surface of target cells have been developed on a model cell line. A panel of cell lines from diverse origins have been exposed to selected conditions, and the changes in cytotoxic activity of NK cells have been investigated. Furthermore, alterations in the T cell surface activation markers composition have been evaluated.

Сиаловые кислоты синтезируются и экспрессируются практически каждой клеткой позвоночных животных и участвуют во множестве различных физиологических процессов [1]. Благодаря своему концевому положению сиаловые кислоты в норме могут влиять на многие иммунные процессы, такие как распознавание патогенов, миграция и презентация антигена, а также другие процессы, не связанные с иммунитетом. Однако гиперсиалирование опухолевых клеток по сравнению с нетрансформированными нормальными клетками благоприятствует их росту. Гиперсиалирование раковых клеток может способствовать развитию и выживанию опухоли множеством различных способов, но одним из ключевых механизмов является модуляция активности иммунных клеток [2]. Также известно, что гиперсиалирование коррелирует с плохим прогнозом для пациентов с различными типами злокачественных новообразований [3]. Актуальность данной работы обусловлена тем, что удаление концевых сиаловых кислот с поверхности опухолевых клеток может стать основой нового направления в иммунотерапии. Цель работы — оценка влияния поверхностных сиаловых кислот на ингибирование иммунной системы человека.

Методы работы включают анализ баз данных и выбор клеточных линий, для которых характерен повышенный уровень представленности сиаловых кислот; оценку десиалирования клеток с помощью проточной цитофлуориметрии; оценку вклада сиаловых кислот, представленных на поверхности опухолевых клеток, в ингибирование клеток иммунной системы здоровых доноров.

В результате анализа литературных данных было выявлено, что в таких показаниях, как меланома, рак поджелудочной железы, гепатоцеллюлярная карцинома, рак яичника и рак молочной железы, чаще встречается α2-3-сиалирование [4–8]. На основе этих выводов был проведен скрининг девяти различных злокачественных клеточных линий, по итогам которого для разработки аналитических методик в качестве модельной была выбрана линия рака молочной железы MDA-MB-231, характеризующаяся наличием высокого уровня поверхностного содержания целевого α2-3-сиалирования, и в меньшей степени α2-6-сиалирования. Далее были подобраны условия для десиалирования клеток с помощью бактериальной нейраминидазы, специфичной к α2-3-сиалированию. В выбранных условиях для удаления поверхностных сиаловых кислот была проведена обработка клеток линий K562, NCI-H460, MCF7 и MDA-MB-231 и последующая оценка изменения цитотоксической активности мононуклеаров периферической крови здоровых добровольцев в от-

© М. Э. Березкина, Д. О. Чернышова, С. А. Нисканен, Д. О. Виноходов, 2024

ношении таргетных клеток. Показано, что в отношении клеточных линий K562 и MDA-MB-231 возрастает цитотоксическая активность NK-клеток. Отсутствие такого эффекта для линий MCF7 и NCI-H460 может быть связано с высоким содержанием на их поверхности лигандов иммунных контрольных точек (ИКТ) [9]. Также оценено влияние десиалирования клеток на изменение поверхностного содержания маркеров активации Т-клеток, таких как CD25, CD69 и CD107a. Таким образом, показано, что удаление концевых сиаловых кислот приводит к изменению уровня активации иммунных клеток.

Вывод: сиаловые кислоты вносят вклад в ингибирование иммунной системы человека, их удаление с поверхности клеток приводит к активации противоопухолевого иммунитета. Результаты данной работы могут быть применены в разработке новых терапевтических агентов для лечения резистентных к другим видам терапии опухолей.

Литература

1. Schjoldager K. T. et al. Global view of human protein glycosylation pathways and functions // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. Vol. 21, No. 12. P. 729–749.

2. Zhou X. et al. Sialylation: A Cloak for Tumors to Trick the Immune System in the Microenvironment // Biol. 2023. Vol. 12, No. 6. P. 832.

3. Rodrigues E., Macauley M. S. Hypersialylation in Cancer: Modulation of Inflammation and Therapeutic Opportunities // Cancers (Basel). 2018. Vol. 10, No. 6.

4. Pietrobono S. et al. ST3GAL1 is a target of the SOX2-GLI1 transcriptional complex and promotes melanoma metastasis through AXL // Nat. Commun. 2020. Vol. 11, No. 1.

5. Rodriguez E. et al. Sialic acids in pancreatic cancer cells drive tumour-associated macrophage differentiation via the Siglec receptors Siglec-7 and Siglec-9 // Nat. Commun. 2021. Vol. 12, No. 1. P. 1–14.

6. Wu H. et al. Overexpression of ST3Gal-I promotes migration and invasion of HCCLM3 in vitro and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma // Onco. Targets. Ther. Dove Press. 2016. Vol. 9. P. 2227–2236.

7. Wu X. et al. Sialyltransferase ST3GAL1 promotes cell migration, invasion, and TGF-β1-induced EMT and confers paclitaxel resistance in ovarian cancer // Cell Death Dis. 2018. Vol. 9, No. 11. P. 1–14.

8. Lin W. Der et al. Sialylation of CD55 by ST3GAL1 Facilitates Immune Evasion in Cancer // Cancer Immunol. Res. Cancer Immunol Res. 2021. Vol. 9, No. 1. P. 113–122.

9. Zheng Y. et al. PD-L1 expression levels on tumor cells affect their immunosuppressive activity // Oncol. Lett. 2019. Vol. 18, No. 5. P. 5399–5407.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-221

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА С БЕЛКОМ S100P НА ЛИНИИ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА THP-1 *

STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR AND S100P PROTEIN ON THE MONOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE THP-1

Л. А. Боброва, М. Ю. Земскова

Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Пущино

L. A. Bobrova, M. Y. Zemskova

Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino

✉ bobrovalola@gmail.com

Аннотация

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) — провоспалительный цитокин, регулирующий дифференцировку моноцитов в макрофаги, также он может участвовать в канцерогенезе. S100P — кальций-связывающий белок, который взаимодействуя с RAGE рецептором, участвует в процессах воспаления, дифференцировке клеток. Нами было установлено, что GM-CSF связывается с S100P. В данной работе изучена биологическая активность этого комплекса.

Abstract

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is a proinflammatory cytokine that regulates the differentiation of monocytes into macrophages; it can also participate in carcinogenesis. S100P is a calcium-binding protein that interacts with the RAGE receptor and assists in the processes of inflammation, proliferation, and differentiation of cells. We have found that GM-CSF binds to S100P. The biological activity of the GM-CSF/S100P complex was investigated in our research.

Рекомбинантные белки S100P и GM-CSF были получены в *E. coli*. Поскольку бактериальные липополисахариды (LPS) могут влиять на жизнеспособность моноцитарных клеток, все белки были проверены на контаминацию LPS методом иммуноферментного анализа. Ранее методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса было установлено, что димерная кальций — связанная форма белка S100P — специфически взаимодействует с GM-CSF с образованием стабильного комплекса [1].

Цель данного исследования — определить, проявляет ли обнаруженный комплекс S100P с GM-CSF биологически значимые воздействия на клетки острого моноцитарного лейкоза THP-1. Для этого был проведен тест на определение роста клеток (MTT-тест) и анализ клеточного цикла в присутствии только GM-CSF, только S100P и предформированного комплекса белков.

Клетки THP-1 были обработаны 20 нг/мл GM-CSF или 20/100/500/700/1000/2000 нг/мл S100P или их комбинациями в течение 48 ч.

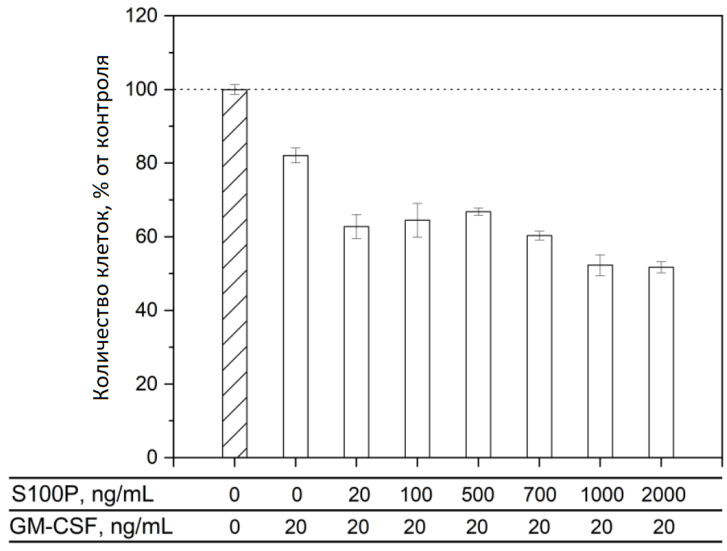


Рис. 1. Изменение количества MTT-положительных клеток THP 1 относительно необработанного контроля в ответ на экзогенный GM-CSF (20 нг/мл) или его комбинацию с S100P (20–2000 нг/мл). Стандартные отклонения указаны

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 19-14-00289).

© Л. А. Боброва, М. Ю. Земскова, 2024

После этого количество жизнеспособных клеток анализировали посредством МТТ-теста. На рис. 1 представлены усредненные данные из 4 независимых экспериментов. Было показано, что добавление 20 нг/мл GM-CSF снижает количество живых клеток в среднем на 20 % относительно контроля, экзогенный S100P — на 12–22 %, а при совместной обработке численность клеток снижается на 35–40 %. Это может быть как аддитивным эффектом двух белков, так и действием их предформированного комплекса.

Для выяснения возможных механизмов действия экзогенных белков и их комплекса на рост клеток THP-1, наблюдаемого в МТТ-тесте, с помощью проточной цитометрии был проведен анализ распределения клеток, обработанных GM-CSF, S100P и их комплексом, по фазам клеточного цикла. Результаты показали, что GM-CSF вызывает замедление клеточного цикла, поскольку наблюдается увеличение клеток в фазе G1 (38 %), с одновременным уменьшением популяции клеток в S (22 %) и G2-фазе (10 %) относительно необработанного контроля (в контроле G1 — 32 %, S — 30 % и G2 — 12 %). В то же время экзогенный S100P в концентрациях 20–700 нг/мл не влияет на клеточный цикл клеток THP-1.

После инкубации клеток с комплексом S100P/GM-CSF (соотношение 1 : 1, 20 нг/мл) наблюдается еще большее замедление клеточного цикла, чем при действии только GM-CSF. Так, количество клеток в фазе G1 составило 45 %, S — 15 % и G2 — 8 % (рис. 2). Учитывая отсутствие эффекта S100P на клеточный цикл, эти данные указывают на биологическую активность комплекса, предполагая, что S100P, будучи связанным с GM-CSF, усиливает его ингибирующее действие на деление клеток. Кроме того, следует отметить, что и GM-CSF, и S100P вызывают увеличение популяции subG1, отражающей апоптоз. При этом при совместном действии белков это значение увеличивается соответственно (рис. 3). Поэтому в случае инициации клеточной гибели можно предположить аддитивный эффект двух белков, а не их комплекса. Следовательно, уменьшение количества жизнеспособных клеток, определенное посредством МТТ-теста после обработки клеток THP-1 экзогенными белками или их комплексом, отражает как замедление клеточного цикла, в результате действия GM-CSF или комплекса GM-

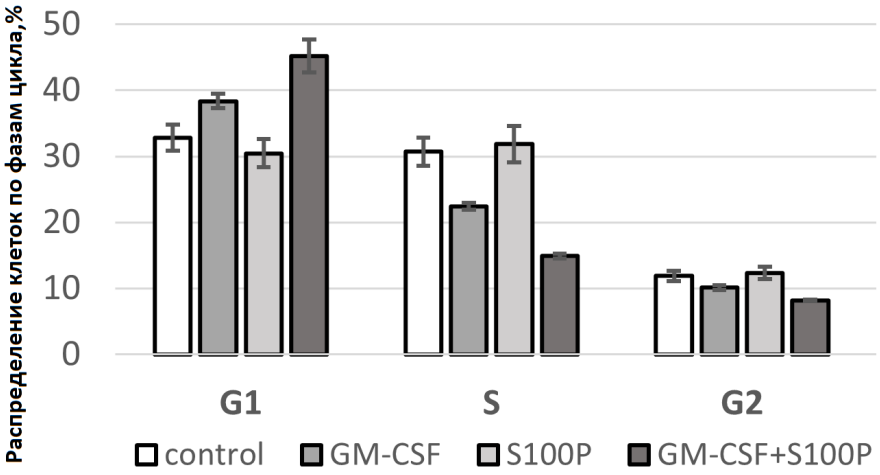


Рис. 2. Влияние S100P, GM-CSF и их комплекса на цикл клеток THP-1

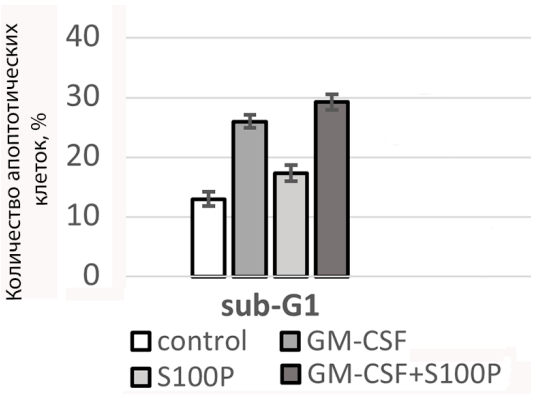


Рис. 3. Апоптотическая гибель клеток THP-1
в результате действия S100P, GM-CSF или их комплекса

CSF/S100P, так и инициацию клеточной гибели, вызванной экзогенными белками. Процессы замедления клеточного деления и частичный апоптоз наблюдаются в культурах первичных моноцитов при добавлении GM-CSF, который инициирует их дифференцировку в макрофаги. Хотя для иммортализованных моноцитарных клеток THP-1 действие только GM-CSF не вызывает их переход в макрофаги, можно предположить частичную инициацию их дифференцировки, и в таком случае комплекс GM-CSF/S100P усиливает этот процесс. Доказательство этой гипотезы является целью наших дальнейших исследований.

Литература

1. Kazakov A. S., Rastrygina V. A., Vologzhannikova A. A. et al. Recognition of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by specific S100 proteins // Cell Calcium. 2024. Vol. 119. P. 102869.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-222

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОГЛИКОЗИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-НАФТОХИНОНА

BIOLOGICAL ACTIVITY OF THIOGLYCOSIDE DERIVATIVES OF 1,4-NAPHTHOQUINONE *

А. Л. Бурылова[1], Ю. Е. Сабуцкий[2], Е. С. Менчинская[2]

[1]*Дальневосточный федеральный университет, Владивосток*
[2]*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова, Владивосток*

A. L. Burylova[1], Yu. E. Sabutsky[2], E. S. Menchinskaya[2]

[1]*Far Eastern Federal University, Vladivostok*
[2]*G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok*

✉ burylova.al@dvfu.ru

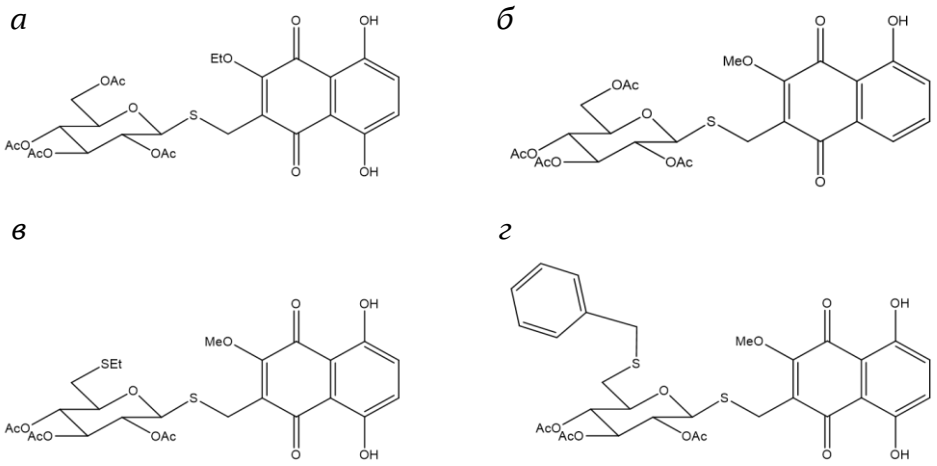
Аннотация

Рак охватывает группу патологий с общими характеристиками, высокой частотой и распространенностью во всем мире. Одной из методик, которая может привести к разработке новых противоопухолевых препаратов, является использование 1,4-нафтохинонов в качестве основы в синтетических или природных продуктах с биологической активностью. Целью настоящей работы является изучение противоопухолевой активности тиогликозидных производных 1,4-нафтохинона в отношении клеточной линии рака шейки матки HeLa.

Abstract

Cancer encompasses a group of pathologies with common characteristics, high frequency and prevalence worldwide. One technique that could lead to the development of new anticancer drugs is the use of 1,4-naphthoquinones as a base in synthetic or natural products with biological activity. The aim of the study was to study the antitumor activity of thioglycoside derivatives of 1,4-naphthoquinone against the HeLa cell line of cervical cancer.

Было проведено исследование цитотоксической активности 40 новых тиогликозидных производных 1,4-нафтохинона в отношении опухолевых клеток человека: Hela (рак шейки матки), HCT-116 (колоректальный рак), THP-1 (лейкемия) SH-SY5Y (нейробластома). В результате экспериментов были обнаружены соединения (см. рисунок), которые значительно влияли на жизнеспособность опухолевых клеток в микромолярном диапазоне концентраций, с $EC_{50} \leqslant 5$ мкМ. Наиболее чувствительной клеточной линий оказалась Hela, которая была отобрана для дальнейшего изучения противоопухолевой активности. Полумаксимальная эффективная концентрация цито-



Химическая структура тиогликозидных производных 1,4-нафтохинона:
а — U-697; *б* — U-704; *в* — U-732; *г* — U-733

* Исследование выполнено в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН.
© А. Л. Бурылова, Ю. Е Сабуцкий, Е. С. Менчинская, 2024

токсического действия изучаемых соединений, полученная с помощью МТТ-теста, составила: U-697 = 2,61 мкМ; U-704 = 1,65; U-732 = 1,25; U-733 = 1,25 при 24 ч инкубирования с клетками. Однако при более продолжительном инкубировании (48 и 72 ч) вещества U-704, U-732 и U-733 не проявили антипролиферативной активности. В то же время соединение U-697 увеличило цитотоксическую активность в микромолярной концентрации на протяжении всего времени эксперимента. Так, EC_{50} за 48 ч составила 1,61 мкМ, а за 72 ч — 0,65 мкМ.

Миграция опухолевых клеток является ключевым фактором метастазирования рака. Методы изучения данного процесса дают возможность выявить механизмы, регулирующие движение опухолевых клеток и их способность к инвазии. Установлено, что исследуемые тиогликозидные производные достоверно тормозят миграцию опухолевых клеток линии HeLa. При действии U-732 и U-733 в концентрациях 1 и 2 мкМ наблюдался эффект торможения и полного блокирования миграции клеток. Соединение U-697 при концентрациях 1 и 2 мкМ подавляет миграцию клеток на 19 и 23 % по сравнению с контролем соответственно.

Процесс колониеобразования опухолевых клеток является ключевым этапом в изучении их размножения, роста, выживания и эффективности лечения. Он представляет собой исследование способности опухолевых клеток к неограниченному росту и размножению в условиях *in vitro*. В живом организме такая тенденция к неконтролируемому росту опухолевых клеток приводит к метастазированию опухоли. Исследуемые производные 1,4-НХ U-697, U-732 и U-733 в концентрации 2 мкМ ингибируют рост колоний опухолевых клеток на 90 % и более. Также стоит отметить, что U-732 и U-733 при концентрации 1 мкМ ингибируют рост колоний опухолевых клеток на 55 и 80 % соответственно.

Апоптоз является ключевым фактором не только для функционирования клеток, но и для предотвращения развития рака. Данный процесс представляет форму «тихой» клеточной гибели, не вызывающей иммунологического ответа. Выявлено, что обработка клеток HeLa тиогликозидными производными 1,4-НХ приводит к индукции в них апоптоза, что выражается в инверсии фосфатидилсерина на внешнюю поверхность плазматических мембран, а также конденсации и фрагментации хроматина в ядрах. В результате исследования индукции апоптоза методом проточной цитофлуорометрии после 24 ч культивирования с тиогликозидными производными 1,4-НХ наблюдались значительные изменения в клетках HeLa. Соединения U-697 и U-704 значительно изменили апоптотический профиль клеток: контрольные клетки содержали 0,87 % в стадии раннего апоптоза, в то время как обработка соединениями U-697 и U-704 увеличила это количество до 8,39 и 3,08 % соответственно. В результате количество живых клеток уменьшилось с 95,07 % в контроле до 58,52 и 56,47 % в клетках, обработанных соединениями U-697 и U-704 соответственно. Соединения U-732 и U-704 проявили меньшую активность: живые клетки, обработанные соединением U-732, составляли 74,51 %, U-733 — 92,63 %. В стадии раннего апоптоза U-732 — 2,47 %, U-733 — 2,37 %.

Конденсация хроматина может быть связана с различными процессами в клетке, такими как клеточный цикл, регуляция экспрессии генов, апоптоз и др. Использование красителя Hoechst 33342 для окрашивания хроматина позволяет визуализировать и изучать эти процессы, в нашем случае апоптоз, на уровне клетки. Обработанные тиогликозидными производными 1,4-НХ клетки HeLa были помечены красителем Hoechst 33324 и проанализированы на конденсацию хроматина с помощью флуоресцентной микроскопии. По сравнению с необработанными клетками, ядра клеток HeLa сжимались, хроматин конденсировался, и, наконец, ядра фрагментировались в апоптотические тела. При концентрации 1 мкМ и инкубировании с веществами 24 ч соединения U-697 и U-733 проявляют наибольшую активность и способны вызывать конденсацию хроматина, что приводит к апоптозу.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-223

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР

PECULIARITIES OF PLASMID DNA MEASUREMENT BY DIGITAL DROPLET PCR

Э. Р. Валиахметова, Д. С. Копеин, П. Ф. Снитко, Н. А. Литвинова

Отдел молекулярной диагностики, Дирекция фармацевтического анализа
АО «Генериум», пос. Вольгинский

E. R. Valiakhmetova, D. S. Kopein, P. F. Snitko, N. A. Litvinova

Department of Molecular Diagnostics, Directorate of Pharmaceutical Analysis
Generium, JSC, Volginsky

✉ e.valiakhmetova@generium.ru

Аннотация

Система цифровой капельной ПЦР с каждым годом становится более востребованной в области молекулярной диагностики за счет того, что с помощью цкПЦР возможно проводить абсолютное количественное определение целевых нуклеиновых кислот, присутствующих в образце. Но цкПЦР имеет ряд нюансов во время измерения разных типов молекул ДНК, один из нюансов описан в данной работе.

Abstract

Every year, the digital droplet PCR system becomes in demand in the field of molecular diagnostics due to the fact that using ddPCR it is possible to carry out an absolute quantitative determination of the target nucleic acids present in the sample. But ddPCR has a number of nuances during the measurement of different types of DNA molecules, one of the nuances is described in this thesis.

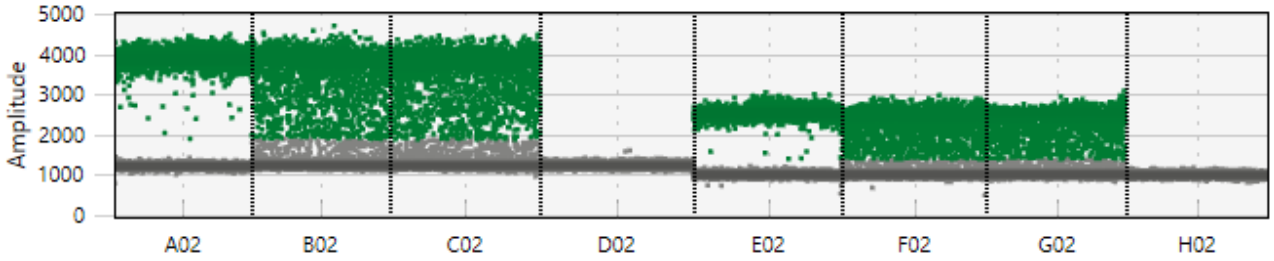
Цифровая капельная ПЦР (цкПЦР) — это третье поколение технологий ПЦР для наиболее чувствительных и высокопроизводительных молекулярно-биологических исследований. С помощью цкПЦР возможно провести точную (до 1 копии на 100 000) количественную оценку того или иного участка ДНК или РНК в образце. При этом нет необходимости в использовании стандартных образцов и построении калибровочных кривых.

Принцип метода цкПЦР состоит в разделении реакции на десятки тысяч капель размером в нанолитр с помощью микрофлюидной технологии, проводимой в генераторе капель специализированного масла. Далее полученную эмульсию подвергают амплификации (денатурация — отжиг — элонгация) при таких же условиях, как и в стандартных протоколах ПЦР, с единственным отличием, что амплификация происходит индивидуально в каждой полученной после генерации капле. Считывание флюоресценции каждой капли происходит в специальном проточном флуориметре. По амплитуде флюоресценции капель определяют наличие или отсутствие в каплях амплификации. При высокой амплитуде флюоресценции капля считается положительной, т. е. содержит как минимум 1 молекулу определяемой ДНК. Количество капель с положительным сигналом (высокой амплитудой флюоресценции) и отрицательным сигналом (низкой амплитудой флюоресценции) делят на кластеры и подсчитывают для каждого образца, и далее согласно распределению Пуасонна рассчитывают концентрацию ДНК-мишени в виде числа молекул в микролитре. В цкПЦР определение количества ДНК-мишени проводят не относительно, используя калибровочную кривую, а прямым подсчетом капель с наличием или отсутствием в них ДНК-мишени. Это существенно увеличивает стабильность и точность системы и, что более важно, для цкПЦР пропадает необходимость в использовании калибраторов или стандартов.

Одним из важных критериев правильного протекания цкПЦР является отсутствие так называемого *эффекта дождя*, который состоит в том, что флюоресценция некоторых капель находится в диапазоне между положительными и отрицательными каплями, из-за чего падает чувствительность измерения, и это затрудняет точное определение концентрации молекул в микролитре. При измерении плазмидной ДНК отсутствия *эффекта дождя* можно добиться разными методами, например с помощью линеаризации кольцевой плазмидной ДНК [1].

На рисунке показано различие между кольцевой формой плазмидной ДНК и линеаризованной. В лунках с кольцевой молекулой плазмидной ДНК четко виден *эффект дождя*. Результаты были проанализированы с помощью ПО QuantaSoft™ Analysis Pro (AP).

© Э. Р. Валиахметова, Д. С. Копеин, П. Ф. Снитко, Н. А. Литвинова, 2024



Гистограммы флюоресценции капель при определении молекул плазмидной ДНК. Лунки A02, E02 — образцы с линеаризованной плазмидной ДНК, лунки B02, C02, F02, G02 — образцы с кольцевой формой плазмидной ДНК, лунки D02, H02 — реакционная смесь без матрицы

На гистограммах флюоресценции (см. рисунок) в лунках B02, C02, F02, G02, где использовали кольцевую форму плазмид, присутствует *эффект дождя* — в этих лунках около 30 % капель имеют промежуточную флюоресценцию. В лунках A02, E02, где использована линеаризованная плазмида, этот эффект минимален. Кроме того, при расчетах наблюдается занижение концентрации в образцах с кольцевой плазмидой в 1,8 раза. Это свидетельствует о том, что часть положительных капель с низкой флюоресценцией (менее 3000 для лунок B02, C02) не определяются как положительные и не вносят вклад в значение конечной концентрации.

Литература

1. Huggett J. F., Foy C. A., Benes V. et al. The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments // Clinical Chemistry. 2013. Vol. 59 (6). P. 892–902.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-224

УСТАНОВЛЕНИЕ ВКЛАДА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX3 В ПОДДЕРЖАНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО СТАТУСА КЛЕТОК ЛЕЙКОЗОВ

THE DETERMINATION OF THE RUNX3 TRANSCRIPTION FACTOR'S CONTRIBUTION TO THE SUSTENANCE OF THE MALIGNANT STATUS OF LEUKEMIA CELLS

В. О. Ведерникова[1,2], П. В. Спирин[2], В. С. Прасолов[2]

[1]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2]*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

V. O. Vedernikova[1,2], P. V. Spirin[2], V. S. Prasolov[2]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

✉ vedernikova.vo@phystech.edu

Аннотация

Установлен вклад RUNX3 в выживаемость клеток ОМЛ и экспрессию ряда генов. Показано, что RUNX3 тесно связан с антиапоптотическим белком Bcl2. Установлено, что *RUNX3* связан с чувствительность к Венетоклаксу. Изучено влияние снижения уровня кислорода на выживаемость клеток ОМЛ, на экспрессию *RUNX3* и *Bcl2*, а также на чувствительность к различным препаратам.

Abstract

We established the contribution of RUNX3 to the survival of AML cell line and to the expression of the number of genes. We demonstrated that RUNX3 is closely connected with the antiapoptotic protein Bcl2. It has been shown that *RUNX3* is associated with the sensitivity to Venetoclax. The effect of a decrease in oxygen level on the survival of AML cells, expression of *RUNX3* and *Bcl2* and the sensitivity to different drugs.

Транскрипционные факторы семейства RUNX характеризуются наличием высококонсервативного ДНК-связывающего runt-домена и представлены у млекопитающих белками RUNX1, RUNX2 и RUNX3. Известно, что они вовлечены в различные сигнальные пути, отвечающие за кроветворение. Считается, что они могут участвовать в развитии злокачественных заболеваний, в том числе злокачественных заболеваний системы крови. Роль RUNX1 в нормальном развитии кроветворных клеток-предшественников и злокачественном перерождении системы крови изучена довольно хорошо, однако RUNX3 остается менее исследованным. Известно, что RUNX3 может выполнять функцию либо онкосупрессора, либо протоонкогена в зависимости от молекулярно-биологического контекста. Однако его роль при лейкозе все еще окончательно не ясна. Цель данной работы заключается в изучении вклада транскрипционного фактора RUNX3 в развитие лейкоза.

Была получена модельная клеточная линия острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с подавленной экспрессией *RUNX3*. Показано, что подавление экспрессии исследуемого гена приводит к снижению выживаемости клеток, а также к изменению экспрессии ряда генов, связанных со злокачественным перерождением. В частности, установлена связь RUNX3 и антиапоптотического белка Bcl2, а также кодирующего его гена. Существенно то, что клетки с подавленной экспрессией *RUNX3* отличаются изменением чувствительности к ингибитору Bcl2 — Венетоклаксу.

Известно, что уровень кислорода является одним из важных факторов, который связан с регуляцией развития как нормальных кроветворных, так и злокачественных лейкозных клеток, а также с регуляцией выживаемости и чувствительностью клеток к различным химиотерапевтическим препаратам. Было показано, что индукция гипоксии приводит к значительному снижению выживаемости клеток ОМЛ. Кроме того, в зависимости от уровня кислорода вклад RUNX3 в выживаемость клеток лейкоза, а также в регуляцию экспрессии генов, кодирующих белки, связанные с выживаемостью, существенно различается. Важным является то, что клетки с подавленной экспрессией *RUNX3* в условиях нормоксии и гипоксии отличаются изменением чувствительности к ряду препаратов, которые применяются или могут быть перспективными для лечения лейкоза. Полученные данные позволяют предположить, что RUNX3 участвует в регуляции механизмов, которые ранее не были описаны в литературе, причем реализация данных процессов в условиях нормоксии и гипоксии не является синонимичной.

© В. О. Ведерникова, П. В. Спирин, В. С. Прасолов, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-225

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КОГЕЗИНА В ОГРАНИЧЕНИИ ПОДВИЖНОСТИ ХРОМАТИНА В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК*

INVESTIGATION OF THE IMPACT OF COHESIN ON CONSTRAINING CHROMATIN DYNAMICS UNDER NORMAL CONDITIONS AND AFTER THE INDUCTION OF DOUBLE-STRAND DNA BREAKS

В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов, М. А. Рубцов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

V. S. Viushkov, N. A. Lomov, M. A. Rubtsov

Lomonosov Moscow State University

✉ vyushkov22@gmail.com

Аннотация

С помощью метода визуализации CRISPR-Sirius в клетках человека с индуцируемой деградацией субъединицы когезина RAD21 мы изучили пространственную динамику локуса хроматина при индукции двунитевых разрывов ДНК этопозидом, при деградации RAD21 и при одновременной деградации RAD21 и индукции разрывов. Мы показали, что когезин выступает ограничителем диффузионной подвижности хроматина как в норме, так и при возникновении двунитевых разрывов.

Abstract

Using CRISPR-Sirius imaging in human cells with inducible degradation of the cohesin subunit RAD21, we studied the spatial dynamics of the chromatin locus upon induction of DNA double-strand breaks by etoposide, upon RAD21 degradation, and upon simultaneous RAD21 degradation and break induction. We showed that cohesin acts as a constraining factor of chromatin diffusion mobility both under normal conditions and upon the induction of double-strand breaks.

Когезиновый комплекс (когезин) считается ключевым фактором, обеспечивающим компактизацию хроматина и сегрегацию генома в клетках млекопитающих на пространственно обособленные петлевые домены, образуя контакты между удаленными друг от друга геномными локусами. Такая модель предполагает, что когезин, компактизуя хроматин, должен ограничивать пространственную динамику локусов хроматина, что может быть особенно важно в случае возникновения в клетках двунитевых разрывов ДНК. В этом случае компактизация хроматина должна уменьшать вероятность рекомбинации и образования хромосомных перестроек между разными геномными локусами, ограничивая подвижность концов двунитевых разрывов.

Основными методами изучения топологии хроматина в настоящий момент являются Hi-C (и его варианты) для анализа геномных контактов и FISH-микроскопия для визуализации расположения локусов в ядре. Эти методы предполагают работу с фиксированными и, как следствие, неживыми клетками, а потому не подходят для изучения динамики хроматина. Чтобы детальнее изучить роль когезина в ограничении пространственной динамики локусов хроматина в нормальном и поврежденном хроматине, мы создали на базе линии клеток человека HCT116 клеточную культуру, в которой с помощью технологии CRISPR-Sirius визуализировали в живых клетках геномный локус, содержащий сайт связывания когезина. Технология CRISPR-Sirius заключается в привлечении к локусу интереса комплекса dCas9 с гидовой РНК, которая содержит восемь MS2-шпилек, узнаваемых белком MCP, слитым с флуоресцентным белком sfGFP (MCP-sfGFP). Локус интереса в нашем случае представлял собой кластер, содержащий 61 тандемный повтор (координаты chr6:157310367-157314361, hg38) и примыкающий к сайту связывания когезина. Такие тандемные повторы узнавались двумя гидовыми РНК, обеспечивая визуализацию целевого локуса.

Для деплеции (индуцируемой деградации) субъединицы RAD21 когезина мы использовали систему ауксин-индуцируемого дегрона. Для этого к кодирующей последовательности гена *RAD21* в геноме культуры клеток HCT116 была добавлена аминокислотная последовательность — дегрон — и в клетках экспрессировалась убиквитинлигаза OsTIR1. При инкубации клеток с ауксином OsTIR1 убиквитинилирует белок с дегроном и направляет его на деградацию, приводя к более чем 90 % деплеции RAD21 в течение четырех часов (время полудеградации составило менее одного часа). Для индукции двунитевых разрывов в клетках мы использовали химиотерапевтический препарат этопозид, являющийся ингибитором ДНК-топоизомераз типа II.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-24-00251).

© В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов, М. А. Рубцов, 2024

Динамику целевого локуса мы изучали в рамках модели аномальной диффузии, анализируя треки индивидуальных флуоресцентных сигналов, полученных путем таймлапс конфокальной микроскопии живых клеток. В качестве меры подвижности визуализированного локуса мы использовали коэффициент диффузии и показатель аномальной экспоненты (α), вычисленные путем MSD-анализа треков. При деплеции RAD21 наблюдалось увеличение подвижности визуализированного геномного локуса (увеличение показателя α, то есть уменьшение степени ограниченности диффузии). Это согласуется с предположением, что когезин выступает в качестве фактора, ограничивающего подвижность хроматина. При глобальной индукции двунитевых разрывов этопозидом не наблюдалось значительного увеличения подвижности визуализированного геномного локуса. Однако если двунитевые разрывы индуцировать на фоне деплеции RAD21, то в этом случае подвижность визуализированного локуса возрастала (увеличивался показатель α). Полученные данные свидетельствуют о том, что когезин является фактором, ограничивающим подвижность хроматина как в норме, так и в условиях индукции двунитевых разрывов. Такие данные позволяют предположить, что выявленная ограничивающая роль когезина может уменьшать вероятность образования хромосомных транслокаций.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-226

РОЛЬ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ БИОПОЛИМЕРОВ В ФОРМИРОВАНИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ А-ТЕЛЕЦ*

THE ROLE OF PHASE TRANSITIONS OF BIOPOLYMERS IN THE FORMATION AND FUNCTIONING OF A-BODIES

А. А. Гаврилова, Я. И. Мокин, А. В. Фонин

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

A. A. Gavrilova, Y. I. Mokin, A. V. Fonin

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉ asultanbekova@incras.ru

Аннотация

Ядрышки при стрессовом воздействии трансформируются в различные структуры. Один из типов таких структур — А-тельца — амилоидоподобные немембранные органеллы, содержащие некодирующую РНК и сотни белков в амилоидном состоянии. Мы представили уточненную модель их формирования, в которой «драйвером» образования этих амилоидных структур является некодирующая РНК.

Abstract

Nucleoli transform into various structures under stress. One type of such structure is A-bodies—amyloid-like membraneless organelles consisting of non-coding RNA and hundreds of proteins in the amyloid state. We studied the structure of the biopolymer components of A-bodies and presented a refined model of their formation, in which the “driver” of the formation of these amyloid structures is non-coding RNA.

Обратимая иммобилизация белков в ядрышке (ядрышковая секвестрация) известна уже более двух десятилетий [1]. Стрессовые условия могут вызывать изменения структуры ядрышка, и в основе этих изменений лежит процесс разделения фаз жидкость-жидкость (LLPS). В результате теплового воздействия и внеклеточного ацидоза образуются амилоидоподобные структуры — А-тельца, содержащие некодирующую РНК, транскрибируемую с межгенного спейсера рибосомальной ДНК (rIGSRNA), и сотни белков в амилоидном состоянии. Эти структуры играют важную роль в ответе клеток на стресс. Их функции заключаются в иммобилизации и сохранении белков без необходимости их синтеза *de novo* после окончания стрессового воздействия. Различные стрессовые воздействия (тепловой шок и внеклеточный ацидоз) вызывают образование А-телец, содержащих разные типы rIGSRNA и существенно различающихся по протеомному составу [2].

Для определения механизма образования А-телец была осуществлена визуализация с помощью конфокальной микроскопии, электронной микроскопии и иммуноэлектронной микроскопии. Продемонстрирована локализация маркерного белка VHL (Von Hippel-Lindau protein), меченого EGFP после теплового воздействия.

Мы исследовали механизм образования А-телец и структуру их биополимерных компонентов, сосредоточившись на изменениях, вызванных различными типами стресса. Биоинформатический анализ протеомного состава А-телец показал значительное содержание «клиентских» белков LLPS в протеоме. А-тельца, сформированные под воздействием внеклеточного ацидоза, обладают более выраженными жидко-капельными свойствами, чем А-тельца, которые образуются при тепловом шоке [3].

Формирование А-телец инициируется сложной коацервацией rIGSRNA с белками. Молекулы rIGSRNA действуют как «драйверы» LLPS при образовании А-телец. Учитывая отсутствие точных данных о структуре rIGSRNA, мы проанализировали транскриптом клеток MCF7 после теплового шока. Этот анализ показал повышение регуляции транскриптов rIGSRNA по сравнению с нестрессированными клетками. rIGSRNA кодируется в межгенной спейсерной области рибосомальной ДНК и имеет чувствительную к тепловому шоку область в районе 16 кб, что было определено с помощью РНК-секвенирования. Четырнадцать участков сверхэкспрессии идентифицированы в области chr21:8,404,499–8,408,349 (HSU13369) в клетках MCF-7, подвергшихся тепловому шоку. Проанализировав полученные данные, мы выбрали наиболее вероятный транскрипт. По литературным дан-

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-45-000-41).

© А. А. Гаврилова, Я. И. Мокин, А. В. Фонин, 2024

ным, интерференция РНК с использованием siRNA, комплементарной этой области, предотвращало образование А-телец [4].

Сверхэкспрессия индуцируемого стрессом локуса rIGSRNA была подтверждена с помощью количественной ПЦР. Далее, используя метод Т7 транскрипции, получили, выделили и охарактеризовали целевую rIGSRNA. С помощью метода кругового дихроизма было показано, что rIGSRNA образует вторичную структуру типа «псевдоузел», что противоречит существующей гипотезе, в соответствии с которой rIGSRNA не имеет упорядоченной структуры. Мы также визуализировали образование кластеров rIGSRNA в ядрышках клеток MCF-7, подвергшихся тепловому стрессу, с помощью метода флуоресцентной гибридизации *in situ*.

В совокупности наши исследования раскрывают ранее неизвестные особенности биогенеза А-телец. Мы полагаем, что формирование А-телец начинается с этапа специфического взаимодействия rIGSRNA с белками, с дальнейшим формированием жидко-капельных «очагов», которые по мере слияния образуют зрелую структуру. Специфичность формирования А-телец различного типа обусловлена вторичной структурой некодирующей РНК, экспрессируемой при разных типах стресса. Таким образом, реорганизация ядрышек в А-тельца является способом клеточного ответа на стресс, в котором иммобилизация белка с помощью некодирующей РНК — это специфический посттрансляционный регуляторный механизм.

Литература

1. Audas T. E., Jacob M. D., Lee S. Immobilization of proteins in the nucleolus by ribosomal intergenic spacer noncoding RNA // Mol. Cell. 2012. Vol. 45 (2). P. 147–157.

2. Audas T. E., Audas D. E., Jacob M. D. et al. Adaptation to Stressors by Systemic Protein Amyloidogenesis // Dev. Cell. 2016. Vol. 39 (2). P. 155–168.

3. Mokin Y. I., Gavrilova A. A., Fefilova A. S. et al. Nucleolar- and Nuclear-Stress-Induced Membrane-Less Organelles: A Proteome Analysis through the Prism of Liquid-Liquid Phase Separation // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24 (13). P. 11007.

4. Wang M., Tao X., Jacob M. D. et al. Stress-Induced Low Complexity RNA Activates Physiological Amyloidogenesis // Cell Rep. 2018. Vol. 24 (7). P. 1713–1721.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-227

НОКАУТ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ IRR ВЛИЯЕТ НА МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ПОЧКИ МЫШИ *

IRR TYROSINE KINASE RECEPTOR KNOCKOUT AFFECTS THE MORPHOLOGICAL STRUCTURE OF THE MOUSE KIDNEY

Е. А. Ганцова[1,2], И. Е. Деев[3], А. В. Ельчанинов[1,2]

[1]Российский университет дружбы народов, Москва
[2]НИИ морфологии человека им А. П. Авцына,
Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва
[3]Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

E. A. Gantsova[1,2], I. Y. Deyev[3], A. V. Elchaninov[1,2]

[1]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow
[2]Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow
[3]Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ gantsova@mail.ru

Аннотация

Исследован фенотип нокаутных по гену *insrr* мышей, описаны изменения тканевой структуры, происходящие в почках мышей при отсутствии pH-чувствительного рецептора IRR. Нокаут гена *insrr* не приводил к какому-либо патологическому нарушению строения почек.

Abstract

The phenotype of mice knockout for the *insrr* gene was studied, and changes in the tissue structure that occur in the kidneys of mice in the absence of the pH-sensitive receptor IRR were described. Knockout of the *insrr* gene did not lead to any pathological disorder of the kidney structure.

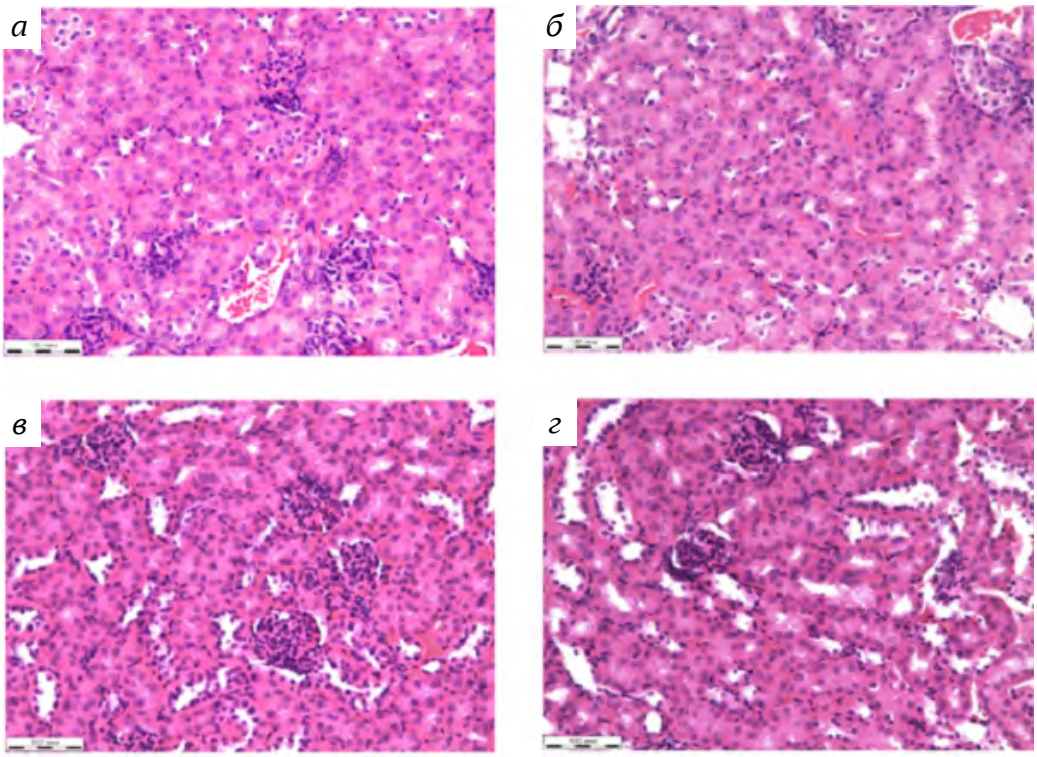
Регуляция уровня кислот и оснований обеспечивается множеством молекулярных механизмов, многие из которых до сих пор не изучены. О существовании в организмах эндогенных pH-сенсоров — молекул, изменяющих свои свойства и активность под действием кислот/оснований, — стало известно не так давно, поэтому активные исследования в этой области продолжаются в настоящее время. Одним из сенсоров щелочного pH является рецептор, подобный рецептору инсулина IRR [1]. Наибольшее количество его было обнаружено в почке, где IRR экспрессируется в β-вставочных клетках, которые секретируют бикарбонат [2].

Для определения влияния нокаута гена рецепторной тирозинкиназы IRR на строение почек было проведено обзорное окрашивание гематоксиллином и эозином криосрезов почек мышей (см. рисунок). На гистологических срезах почек нокаутных животных, как в условиях нормы, так и при моделировании алкалоза, наблюдали строение типичной паренхимы почек. Можно сделать вывод, что нокаут гена *insrr* не приводил к какому-либо патологическому нарушению строения почек. После получения изображений тканей проводили измерение площади каждого почечного тельца и толщины коркового и мозгового вещества с помощью Image Scope M. Обнаружили значительное увеличение площади почечных клубков у животных дикого типа в нормальных условиях по сравнению с нокаутными мышами в условиях щелочного pH. Нокаут гена *insrr* не приводил к изменению площади почечного тельца, однако показано, что моделирование алкалоза, протокол описан в статье [3], приводило к значимому увеличению его площади. Также наблюдали увеличение ширины просвета собирательных трубочек у животных дикого типа в нормальных условиях, нежели в случае с этим же генотипом при щелочной нагрузке. Однако животные дикого типа демонстрируют больший просвет собирательных трубочек, чем нокаутные по гену *insrr*. В целом размер почек у нокаутных мышей оказался меньше, чем у мышей дикого типа.

Для подсчета количества вставочных клеток соединительных трубочек почки провели тройное иммунофлуоресцентное окрашивание на маркерные белки α- и β-вставочных клеток — AE1, пендрин и E-субъединицу АТФазы V-типа. AE1 является маркером α-вставочных клеток, которые имеют АТФазу V-типа на апикальной

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-45-00031).
© Е. А. Ганцова, И. Е. Деев, А. В. Ельчанинов, 2024

мембране и анионообменник (AE1) на базолатеральной мембране. Пендрин-положительные β-вставочные клетки характеризуются апикальной экспрессией пендрина и базолатеральной экспрессией АТФазы V-типа. Количество α- и β-вставочных клеток в почках мышей с нокаутом *insrr* не менялось. Также мы не наблюдали каких-либо изменений числа вставочных клеток при щелочной нагрузке у мышей обоих генотипов.



Окрашивание почек гематоксилин-эозин, увеличение 20х: *а* — WT (IRR+/+) в нормальных условиях, *б* — WT (IRR+/+) в условиях бикарбонатной нагрузки, *в* — KO (IRR –/–) в нормальных условиях, *г* — KO (IRR –/–) в условиях бикарбонатной нагрузки. Масштабная линейка — 100 мкм

Популяцию макрофагов почек изучали с помощью определения маркерного белка провоспалительных макрофагов — CD86, а также маркерного белка противовоспалительного макрофага — CD206. Макрофаги, экспрессирующие указанные маркеры, распределены неравномерно между корковым и мозговым веществом.

У животных, нокаутных по гену *insrr,* сохраняется нормальное гистологическое строения почки, что характерно как для физиологических условий, так и для алкалоза. В условиях нормы толщина паренхимы больше у мышей дикого типа, в сравнении с мышами, нокаутными по гену *insrr*. Моделирование алкалоза приводит к увеличению толщины паренхимы как нокаутных, так и диких животных, что сопровождается увеличение площади почечных телец и почечных канальцев. Нокаут гена *insrr* не приводит к провоспалительной активации макрофагов почек, о чем свидетельствует локализация CD86+ только в составе почечных телец, а также одинаковое количество CD206+ макрофагов в почке животных дикого типа и с нокаутом.

Литература

1. Deyev I. E. et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor // Cell Metab. 2011. Vol. 13, No. 6. P. 679–689.

2. Petrenko A. G. et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid-base balance // Biochimica et Biophysica Acta — Proteins and Proteomics. 2013. Vol. 1834, No. 10. P. 2170–2175.

3. Gantsova E. A., Serova, O. V., Eladari, D. et al. A Comparative Kidney Transcriptome Analysis of Bicarbonate-Loaded insrr-Null Mice // Current Issues in Molecular Biology. 2023. Vol. 45, No. 12. P. 9709–9722.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-228

РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА E2F1 В РАЗВИТИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК ЛЕЙКОЗОВ *

THE ROLE OF THE E2F1 TRANSCRIPTION FACTOR IN THE DEVELOPMENT OF CHEMORESISTANCE IN LEUKEMIA CELLS

К. А. Глумакова[1,2], П. В. Спирин[2], В. С. Прасолов[2]

[1] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2] *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

K. A. Glumakova[1,2], P. V. Spirin[2], V. S. Prasolov[2]

[1] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2] *Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

✉ kglumakova@mail.ru

Аннотация

В данной работе мы использовали модельные клетки лейкозной линии K562, несущие репортерную конструкцию, для исследования активности транскрипционного фактора E2F1. Показано, что чувствительность злокачественных клеток к химиотерапевтическим препаратам в условиях пониженного уровня кислорода и при взаимодействии с компонентами стромального микроокружения в значительной степени зависит от уровня активности транскрипционного фактора E2F1.

Abstract

In this work, we used model cells of the K562 leukemia line with a reporter to study the activity of the E2F1 transcription factor. We found that the sensitivity of malignant cells to chemotherapeutic drugs under conditions of low oxygen levels and when interacting with components of the stromal microenvironment highly depends on the level of activity of the E2F1 transcription factor.

Развитие лейкозов связано с возникновением мутаций в геноме стволовых кроветворных клеток, что приводит к изменению активности сигнальных каскадов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку незрелых клеток крови, и нарушению их взаимодействия с компонентами стромального микроокружения. В случае лейкозов стромальное микроокружение способно оказывать аномальное поддерживающее действие в отношении злокачественных клеток, что приводит к снижению их чувствительности к цитотоксическому действию химиотерапевтических препаратов. Установление факторов, ассоциированных с развитием стромозависимой резистентности, представляет значительный интерес для современной науки. Одним из факторов транскрипции, изменение регуляции которого часто наблюдается при развитии лейкозов, является транскрипционный фактор E2F1, принадлежащий к семейству транскрипционных факторов E2F. Роль и механизмы действия E2F1 в развитии лейкозов до сих пор в точности не изучены. Известно, что фактор E2F1 может обладать как пролиферативным, так и проапоптотическим действием. Ряд сведений указывает на то, что данный фактор может быть вовлечен в регуляцию взаимодействия лейкозных клеток с клетками стромального микроокружения. Целью данного исследования является установление роли транскрипционного фактора E2F1 в снижении чувствительности лейкозных клеток к воздействию химиотерапевтических препаратов в присутствии компонентов стромального микроокружения.

Для этого ранее были получены модельные клетки лейкозной клеточной линии K562, несущие репортерную конструкцию, для исследования активности транскрипционного фактора E2F1. Такая модельная клеточная линия была использована для получения субпопуляций клеток с относительно высоким и относительно низким уровнем активности фактора E2F1. Показано, что клетки с относительно низким уровнем активности E2F1 обладают меньшей чувствительностью к химиотерапевтическим препаратам цитарабину и доксорубицину по сравнению с клетками с высоким уровнем активности E2F1. При этом обработка цитарабином клеток с низким уровнем активности E2F1 приводит к более выраженной индукции апоптоза по сравнению с клетками с высоким уровнем активности фактора E2F1. Известно, что существенным параметром, влияющим на нормальные и трансформированные клетки в гемопоэтической нише, является уровень насыщенности тканей костного мозга кислородом.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-14-00353).

© К. А. Глумакова, П. В. Спирин, В. С. Прасолов, 2024

Показано, что в условиях гипоксии (5 % O_2) чувствительность клеток с высоким уровнем активности E2F1 снижается, в то время как чувствительность клеток с низким уровнем активности E2F1 увеличивается. Это свидетельствует в пользу того, что пониженный уровень кислорода, который характерен для кроветворной ниши, является одним из существенных факторов, которые могут влиять за стромозависимую химиорезистентность клеток лейкозов. Оценено влияние активности фактора E2F1 на выживаемость клеток лейкозной клеточной линии K562 в смешанной культуре с клетками стромального происхождения HS-5. Показано, что в смешанной культуре клетки лейкозной клеточной линии K562 с относительно низким уровнем активности фактора E2F1 отличаются лучшей выживаемостью по сравнению с клетками с высоким уровнем активности фактора E2F1. При этом существенного различия в индукции апоптоза между лейкозными клетками, склонными к адгезии, и клетками в суспензионной фракции смешанной культуры не наблюдается. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что чувствительность клеток злокачественного происхождения к химиотерапевтическим препаратам в условиях гипоксии и при взаимодействии с компонентами стромального микроокружения в значительной степени зависит от уровня активности транскрипционного фактора E2F1.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-229

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА NS1 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА *

CHARACTERIZATION OF THE ANTIGENIC PROPERTIES OF THE RECOMBINANT NS1 PROTEIN OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Н. Н. Голосова, Я. А. Хлусевич, Б. И. Кравчук, А. Л. Матвеев, Л. А. Емельянова, Н. В. Тикунова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

N. N. Golosova, Ya. A. Khlusevich, B. I. Kravchuk, A. L. Matveev, L. A. Emelyanova, N. V. Tikunova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ n.golosova@g.nsu.ru

Аннотация

Известно, что гликопротеин NS1 играет важную роль в патологии клещевого вирусного энцефалита (КЭ), а в крови пациентов с клещевым энцефалитом обнаруживаются NS1-специфические антитела. В данной работе белок NS1 вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) был получен в клетках HEK 293. Полученный рекомбинантный белок NS1 ВКЭ проявлял иммунологические свойства, сходные с нативным белком NS1.

Abstract

There is evidence that NS1 glycoprotein plays an important role in the pathology of tick-borne encephalitis (TBE) and NS1-specific antibodies are detected in the blood of patients with TBE. In this study, TBEV NS1 protein was produced in HEK 293 cells. Obtained protein showed immunological properties similar to the native NS1 protein.

Одноцепочечный (+)РНК-вирус *Orthoflavivirus encephalitidis*, более известный как вирус клещевого энцефалита, передается при укусе нескольких видов иксодовых клещей. Ген NS1 кодирует один из семи неструктурных белков ВКЭ, длина белка NS1 составляет 352 а. о, а молекулярная масса зависит от его гликозилирования и составляет около 46–55 кДа. Несмотря на высокую идентичность генов, кодирующих гликопротеины NS1, между всеми флавивирусами, эпитопные структуры этих белков разнообразны. NS1 существует в нескольких олигомерных формах и обнаруживается в различных клеточных компартментах. Внутриклеточный NS1 ко-локализуется с дцРНК и другими компонентами комплекса репликации вируса. Секретируемый и связанный с клеточной поверхностью NS1 обладает высокой иммуногенностью. Было показано, что NS1 флавивирусов, переносимых комарами, участвует в нарушении проницаемости эндотелия сосудов, легких и мозга. Кроме того, NS1 этих вирусов может ингибировать продукцию интерферонов, подавляя противовирусный иммунитет, может активировать комплемент, чтобы вызвать комплемент-зависимую цитотоксичность в эндотелиальных клетках. На сегодняшний день нет данных о роли NS1 ВКЭ в патогенезе КЭ, хотя известно, что иммунизация мышей NS1 ВКЭ приводит к формированию протективного иммунитета.

Для получения рекомбинантного белка NS1 была использована ранее сконструированная плазмида pSB-NS1-sof, содержащая ген, кодирующий NS1 ВКЭ. Плазмидами pSB-NS1-sof и pSB100x были ко-трансформированы клетки HEK 293. Через 48 ч после трансфекции с помощью клеточного сортера SH800S была получена GFP-положительная популяция клеток. Отдельные клоны были получены методом предельных разведений. Продуктивность полученных клонов оценивали с помощью проточного цитофлуориметра Novocyte по интенсивности сигнала GFP.

Для наработки рекомбинантного NS1 был использован клон-продуцент 293/TBEV-NS1 с наибольшим уровнем экспрессии GFP. Рекомбинантный белок нарабатывали в 100 мл среды, выделяли из культуральной жидкости с помощью металлохелатной хроматографии на Ni-NTA агарозе и диализовали против натрий-фосфатного буфера. Выход рекомбинантного NS1 составил около 10 мг с 1 л культуральной жидкости.

Электрофоретический анализ очищенного рекомбинантного NS1 в 12%-м ПААГ показал высокую степень чистоты и гомогенности полученного препарата белка. Молекулярная масса очищенного белка NS1 соответствует теоретически предсказанной — 45 кДа.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-74-10103).

© Н. Н. Голосова, Я. А. Хлусевич, Б. И. Кравчук, А. Л. Матвеев, Л. А. Емельянова, Н. В. Тикунова, 2024

Корректность фолдинга рекомбинантного белка NS1 исследовали с помощью иммуноферментного и вестерн-блот-анализа с использованием моноклональных антител NS1-1.3, NS1-1.6, NS1-2.299, NS1-2.290, NS1-2.44 против вирусного NS1 белка ВКЭ, полученных ранее с использованием нативного NS1 белка и иммунной асцитной жидкости. В качестве отрицательного контроля использовали мышиное антитело 3G11 против бета-глюкана. Было показано, что антитела NS1-1.3, NS1-1.6, NS1-2.299, NS1-2.290, NS1-2.44 и иммунная асцитная жидкость выявляют белок NS1 как в ИФА, так и в вестерн-блот-анализе, что может свидетельствовать о его корректном фолдинге.

Таким образом, нами был получен эукариотический штамм-продуцент белка NS1 ВКЭ и очищенный препарат этого белка. С использованием специфических моноклональных антител и иммунной асцитной жидкости было показано, что наш полученный белок NS1 имеет корректный фолдинг и может быть использован для дальнейшего изучения роли этого белка в патогенезе клещевого энцефалита.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-230

ОЦЕНКА БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБИОМА ЭНДОСКОПИЧЕСКИ ЗДОРОВОЙ И ПОВРЕЖДЕННОЙ СЛИЗИСТОЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

ASSESSING THE BIODIVERSITY OF THE MICROBIOME OF ENDOSCOPICALLY HEALTHY AND INFLAMMATORY COLONIC MUCOSA IN CHILDREN WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

А. В. Горбач[1], Е. П. Михаленко[1], Л. И. Кастюкевич[2], О. Н. Романова[2], А. В. Кильчевский[1]

[1] *Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск*
[2] *Белорусский государственный медицинский университет, Минск*

A. V. Gorbach[1], A. P. Mikhalenka[1], L. I. Kastukevich[2], O. N. Romanova[2], A. V. Kilchevsky[1]

[1] *Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk*
[2] *Belarusian State Medical University, Minsk*

✉ gorbach.alexandra@yandex.ru

Аннотация

Проведен метатаксономический анализ микробного состава в эндоскопически здоровых (группа Control) и поврежденных (группа Damaged) участках слизистой оболочки у детей с воспалительными заболеваниями кишечника с использованием секвенирования фрагментов генов 16S рРНК. Выявлены различия между исследуемыми группами в относительной представленности доминирующих бактериальных семейств. Однако статистически значимых различий альфа- и бета-разнообразия микробных сообществ не выявлено.

Abstract

A comparative analysis of the microbial composition in endoscopically healthy (group Control) and inflamed (group Damaged) mucosal areas in children with inflammatory bowel disease was conducted using metataxonomic analysis by 16S rRNA gene fragment sequencing. Differences in the relative abundance of dominant bacterial families were identified. However, statistically significant differences in the alpha and beta diversity of microbial communities weren't found.

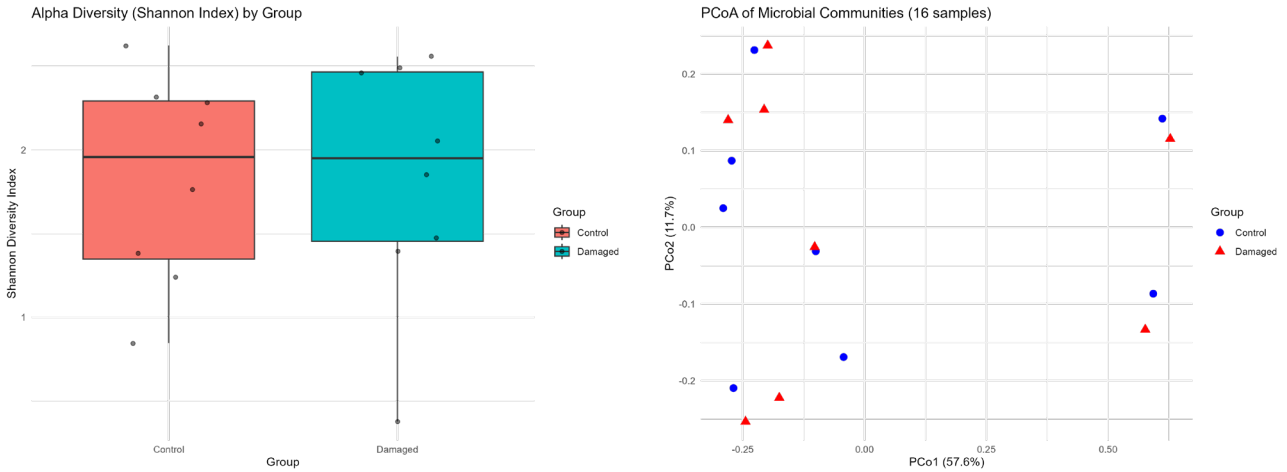
Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) представляют собой группу хронических идиопатических патологий желудочно-кишечного тракта, являющихся значимой проблемой в педиатрической гастроэнтерологии. Особый интерес в контексте патофизиологии ВЗК представляет кишечный микробиом, характеризующийся значительной вариабельностью не только при сравнении микробиоты пациентов с ВЗК и здоровых индивидуумов, но и между различными топографическими зонами кишечника у одного и того же пациента. Изучение локальных различий в составе микробиома может предоставить ценную информацию о факторах, способствующих развитию и прогрессированию воспалительного процесса при ВЗК.

В исследование было включено 8 пациентов с различными формами ВЗК, у каждого из которых одновременно были взяты образцы биопсии толстой кишки из двух участков: эндоскопически здорового (группа Control) и эндоскопически поврежденного (группа Damaged). Анализ микробиома проведен методом 16S-секвенирования (регионы V3–V4). Обработка данных выполнена с использованием пайплайна DADA2 в R, включая удаление праймеров (функция removePrimers) и стандартные этапы обработки метагеномных данных. Оценка качества библиотек проведена с помощью FastQC V.0.11.9. Таксономическая классификация осуществлена по базе SILVA 138.2. Оценка разнообразия включала расчет индексов альфа-разнообразия (Шеннон, Симпсон) и бета-разнообразия (UniFrac, Bray-Curtis, пакет vegan). Визуализация бета-разнообразия проведена методом анализа главных координат (PCoA) с применением ggplot2. Сравнительный анализ выполнен с использованием теста Уилкоксона и PERMANOVA.

Не выявлено статистически значимых различий альфа-разнообразия ($p = 0{,}798$) и бета-разнообразия ($p = 0{,}995$) микробных сообществ в группах Control и Damaged (см. рисунок). Визуализация данных анализа PCoA показывает, что образцы от одного индивидуума (из здоровой и поврежденной слизистой) демонстрируют пространственную близость. Это указывает на меньшую внутрииндивидуальную вариабельность состава микробиома по сравнению с межиндивидуальной.

Далее был проведен анализ относительной численности 10 лидирующих семейств микроорганизмов в исследуемых группах. В группе Control наибольшую представленность имели семейства *Streptococcaceae* (около

© А. В. Горбач, Е. П. Михаленко, Л. И. Кастюкевич, О. Н. Романова, А. В. Кильчевский, 2024



Анализ альфа- и бета-разнообразия микробиомных сообществ в исследуемых группах

17 %) и *Enterobacteriaceae* (около 12 %). Напротив, в группе с поврежденной слизистой доминировали семейства *Oscillospiraceae* (около 12 %) и *Ruminococcaceae* (около 11 %). Другие семейства, наоборот, демонстрировали снижение численности в поврежденной ткани: *Streptococcaceae* (2 % против 17) и *Enterobacteriaceae* (8 % против 12). Не выявлено различий между группами по относительной численности представителей семейств, *Bacteroidaceae, Enterococcaceae* и *Erysipelotrichaceae* показали относительно небольшие изменения.

Таким образом, в нашем исследовании выявлены различия в относительной численности десяти лидирующих семейств микроорганизмов между неповрежденными и поврежденными участками слизистой толстой кишки у пациентов с ВЗК. Анализ PCoA также показал меньшую внутриндивидуальную вариабельность состава микробиома по сравнению с межиндивидуальной, однако не выявлено статистически значимых различий альфа- и бета-разнообразия между группами. Для подтверждения полученных результатов и выявления более тонких различий необходимо проведение дальнейших исследований с увеличением размера выборки, что позволит повысить статистическую мощность анализа и глубже понять роль микробиома в патогенезе ВЗК.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-231

ПОИСК И ТЕСТИРОВАНИЕ НОВОЙ РНК-НАПРАВЛЯЕМОЙ РНК-НУКЛЕАЗЫ ТИПА VG НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕНИЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЯХ*

SEARCH AND TESTING OF A NOVEL RNA-GUIDED VG TYPE RNA NUCLEASE BASED ON THE ANALYSIS OF METAGENOMIC DATA, VALIDATION OF ITS FUNCTIONALITY AND APPLICATION

Н. М. Гуницева, М. А. Евтеева, А. А. Кузьминкова

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

N. M. Gunitseva, M. A. Evteeva, A. A. Kuzminkova

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow

✉ natgunitseva@gmail.com

Аннотация

В работе исследуется новая РНК-направляемая РНК-нуклеаза Cas12g, обнаруженная в метагеномах термофильных микробных сообществ во время экспедиции в Республику Северная Осетия — Алания. Обнаруженные свойства белка показывают, что он может стать перспективным инструментом для создания тест-систем.

Abstract

The study examines a new RNA-guided RNA nuclease Cas12g, discovered in the metagenomes of thermophilic microbial communities during an expedition in the Republic of North Ossetia—Alania. The properties of the discovered protein suggest that it could become a promising tool for molecular diagnostics.

CRISPR-Cas-система — это адаптивная иммунная система, которая широко распространена среди архей и бактерий и защищает их от вторжения вирусов и другого чужеродного генетического материала. Система состоит из эффекторного белка Cas, который осуществляет гидролиз нуклеиновой кислоты, и молекулы гидовой РНК, которая направляет рибонуклеопротеиновый комплекс на сайт-мишень [1]. Поиск и исследование новых нуклеаз с целью расширения набора инструментов CRISPR-Cas является одним из перспективных направлений в молекулярной биологии. Особенный интерес представляют эффекторы подтипов систем класса 2, в частности системы V типа. Нуклеазы типа V содержат консервативный RuvC-подобный эндонуклеазный домен и обычно расщепляют в качестве субстрата молекулы ДНК. Однако системы V-G отличаются тем, что проявляют РНКазную активность [2]. Кроме того, они демонстрируют коллатеральную активность в отношении молекул РНК и оцДНК [3]. Редактирование РНК представляет собой перспективную альтернативу редактированию генома, поскольку данный подход снижает вероятность появления неконтролируемых мутантных вариантов. Также, в отличие от редактирования ДНК, распознаванию РНК не препятствуют модификации ДНК и доступность хроматина. Это привело к всплеску использования технологии редактирования РНК, которая открывает многочисленные возможности [4].

В работе исследуется ранее не описанная нуклеаза Cas12g, которая была обнаружена в метагеномных данных термофильных микробных сообществ из термальных источников Кармадонского ущелья на высоте 2330 м над уровнем моря [5]. Найденный CRISPR-локус содержал ген *cas12g*, кодирующий 768 аминокислот, CRISPR-массив, содержащий 10 повторов сразу после гена *cas12g*, и область, кодирующую tracrRNA, расположенную ниже гена *cas12g*, с частичной гомологией с повторами массива CRISPR. Ген-кандидат Cas12g, скорее всего, принадлежит представителю класса Terriglobia. По данным NCBI CDD, С-конец гена-кандидата гомологичен белкам семейства РНК-направляемых эндонуклеаз TnpB, включающих CRISPR-ассоциированные белки, такие как CRISPR-ассоциированный белок C2c8 типа V [6]. Чтобы подтвердить, что идентифицированный CRISPR локус является функциональной системой CRISPR-Cas, Cas12g был экспрессирован в *E. coli* с С-концевой гексагистидиновой (His)-меткой. Очистку белка осуществляли металлохелатной хроматографией и гель-фильтрацией. Для исследования активности цис-расщепления эффектора Cas V-G были проведены реакции *in vitro* разрезания РНК PAM-библиотеки, содержащей последовательность 8N. Также было показано, что при связывании

* Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

© Н. М. Гуницева, М. А. Евтеева, А. А. Кузьминкова, 2024

с РНК-мишенью активируется неспецифическое транс-расщепление РНК. Чтобы подтвердить, что Cas12g также активен в отношении оцДНК, были проведены эксперименты в присутствии зонда ДНК, меченного флуорофором и гасителем.

Разработка систем CRISPR-Cas, нацеленных на РНК, открывает новые возможности для редактирования РНК и регуляции на посттранскрипционном уровне [7]. Полученная и охарактеризованная новая нуклеаза типа VG в дальнейшем также может успешно применяться в диагностических тест-системах для обнаружения РНК различных патогенов.

Литература

1. Sorek R., Kunin V., Hugenholtz P. CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea // Nature Reviews Microbiology. 2008. Vol. 6, No. 3. P. 181–186.

2. Zetsche B. et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system // Cell. 2015. Vol. 163, No. 3. P. 759–771.

3. Liu M. et al. Structural transitions upon guide RNA binding and their importance in Cas12g-mediated RNA cleavage // PLoS Genetics. 2023. Vol. 19, No. 9. P. e1010930.

4. Beljouw van S. P. B. et al. RNA-targeting CRISPR–Cas systems // Nature Reviews Microbiology. 2023. Vol. 21, No. 1. P. 21–34.

5. Toshchakov S. V. et al. Culture-independent survey of thermophilic microbial communities of the North Caucasus // Biology. 2021. Vol. 10, No. 12. P. 1352.

6. Wang J. et al. The conserved domain database in 2023 // Nucleic Acids Research. 2023. Vol. 51, No. D1. P. D384–D388.

7. Kadam U. S. et al. Aptamer-based CRISPR-Cas powered diagnostics of diverse biomarkers and small molecule targets // Applied Biological Chemistry. 2023. Vol. 66, No. 1. P. 13.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-232

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА NBAS В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА И ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ

IDENTIFICATION OF NBAS PROTEIN IN HUMAN SKIN FIBROBLASTS AND IMMORTALIZED CELL LINES

А. А. Гурьев, М. Т. Саввина

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

A. A. Guryev, M. T. Savvina

Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk

✉ kotetolya@gmail.com

Аннотация

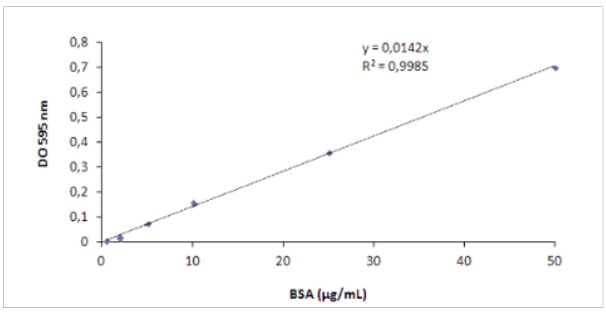
Белок NBAS является частью комплекса синтаксина 18 (STX18), нарушение функции которого приводит к различным патологическим состояниям, одно из которых — SOPH-синдром. Исследование белка NBAS будет весьма актуальным и способствует раскрытию молекулярных механизмов патогенеза и фундаментальным исследованиям с целью выявления терапевтических таргетов данного заболевания.

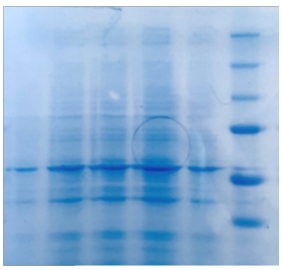
Abstract

The NBAS protein is part of the syntaxin 18 (STX18) complex and its dysfunction leads to various pathological conditions, one of which is SOPH syndrome. The study of the NBAS protein will be very relevant and will contribute to the disclosure of the molecular mechanisms of pathogenesis and fundamental research to identify therapeutic targets for this disease.

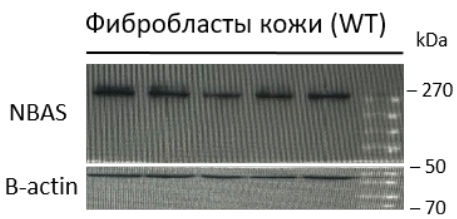
SOPH-синдром — моногенное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, для которого характерны низкий рост, атрофия зрительных нервов, пельгеровская аномалия лейкоцитов. В популяции якутов Республики Саха (Якутия) встречается с частотой 18 : 100 000. Вызывается мутацией, локализованной в G5741 → → A (R1914H) С-терминале гена NBAS. Белок NBAS является частью комплекса синтаксина 18 (STX18), который участвует в ретроградном транспорте везикул из аппарата Гольджи (аГ) до эндоплазматического ретикулума.

а *б*





в



Детекция белка NBAS дикого типа в фибробластах кожи: *а* — измерение общей концентрации белка в лизате клеток по Брэдфорду, *б* — электрофорез на полиакриламидном геле, *в* — иммуноблоттинг

© А. А. Гурьев, М. Т. Саввина, 2024

Целью работы является определение белка NBAS в фибробластах кожи человека и клеточных линиях Hela. Первичные культуры фибробластов кожи были получены на 14-е сутки после посадки биоптата на чашу петри. Для культивирования использовалась среда DMEM с высоким содержанием глюкозы и пирувата натрия (с добавлением бычьей сыворотки и смеси антибиотиков), инкубация проводилась в 37 °C содержанием CO 5 %. Для лизиса клеток был использован буфер RIPA. Ингибитор протеазы PMSF добавлялся непосредственно перед лизисом. Для количественного анализа общего белка был применен метод по Брэдфорду. Пул из выделенных белков был разделен на 7,5%-м полиакриламидном геле путем электрофореза. Перевод белков с геля на мембрану был проведен мокрым методом с использованием PVDF-мембраны. Для иммуноблоттинга использовались первичные антитела Anti-NBAS поликлональные, кроличьи, Abcam (США), вторичные антитела против кролика, Servicebio. На рисунке видно разделение белков разного размера. На уровне выше 260 кДа визуализировался белок NBAS, что свидетельствует о его хорошей экспрессии в клетках у здорового индивида. Также он определялся и в клетках Hela, что говорит о значимости данного белка в разных типах клеток. Продолжаются исследования, посвященные анализу экспрессии белка NBAS в фибробластах кожи, полученных от больных SOPH-синдромом, и вклада мутации c.5741G>A в ген NBAS, экспрессирующий данный белок.

Последующее изучение данного белка и взаимодействующих в комплексе с ним белков в патологических состояниях, например у больных с SOPH-синдромом, будет весьма актуальным и способствует раскрытию молекулярных механизмов патогенеза и фундаментальным исследованиям с целью выявления терапевтических таргетов данного заболевания.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-233

ПИКОВЫЕ И СТАЦИОНАРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ОТВЕТОВ ASIC2A ИМЕЮТ РАЗНУЮ ИОННУЮ СЕЛЕКТИВНОСТЬ*

PEAK AND STEADY-STATE COMPONENTS OF THE RESPONSE HAVE DIFFERENT ION SELECTIVITY

К. К. Евланенков

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

K. K. Evlanenkov

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ konstantin361@iephb.ru

Аннотация

Протон-активируемые ионные каналы (ASICs) широко представлены в центральной и периферической нервной системе позвоночных животных. В данной работе было показано, что ASIC2a-каналы обладают двумя открытыми состояниями с разной ионной селективностью.

Abstract

Acid-sensing ion channels (ASICs) are widely expressed in the central and peripheral nervous system of vertebrates. In this work, it has been shown that ASIC2a channels possess two open states with different ionic selectivity.

Протон-активируемые ионные каналы активируются быстрым падением pH внеклеточной среды [1]. Они вовлечены во многие физиологические и патологические процессы, такие как синаптическая передача, синаптическая пластичность, память, обучение, страх, восприятие боли, депрессия, эпилепсия, инсульт и др. [2]. Изучение структурных особенностей протон-активируемых ионных каналов и механизмов действия их модуляторов необходимо для направленного синтеза высокоселективных лигандов, которые могут использоваться в физиологических исследованиях и, в конечном итоге, в медицинской практике. Одним из важных различий между ASIC1a и ASIC2a является наличие у последних стационарного компонента ответа на закисление [3].

Ранее нами было установлено, что пиковый и стационарный компоненты ответа ASIC2a-каналов имеют разную чувствительность к блокатору диминазену и потенциатору Ru-1355 [4]. Целью данного исследования было сравнение пикового и стационарного компонентов по ионной селективности.

Эксперименты проводились на рекомбинантных рецепторах, трансфицированных в клетках линии CHO. Клетки культивировались в CO_2-инкубаторе при 37 °C и 5 % CO_2 и контроле относительной влажности. Среда для роста клеток состояла из DMEM/F12 (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium), эмбриональной коровьей сыворотки (10 %) и антибиотика гентамицина (50 мкг/мл). Трансфекция проводилась с помощью реагента Lipofectamine 2000 согласно протоколу производителя. Регистрация токов осуществлялась методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка». Состав стандартных растворов — содержимое микропипетки (в mM): CsF 100, CsCl 40, NaCl 5, $CaCl_2$ 0.5, EGTA 5, HEPES 10; внеклеточный раствор (в mM): NaCl 143, KCl 5, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1, D-glucose 18, MES 10, HEPES 10. Состав инвертированных растворов — содержимое микропипетки (в mM): NaCl 150, HEPES 10, EGTA 10; внеклеточный раствор (в mM): KCL 150, HEPES 10, MES 10, $CaCl_2$ 2.5. Растворы с низкими значениями pH, которые использовали для активации ASICs, получали добавляя HCl во внеклеточный раствор.

Поскольку ASICs имеют преимущественно натриевую проводимость, в стандартных растворах потенциал реверсии находится в положительном диапазоне значений, в которых регистрация токов усложнена. Сопоставление пиковых и стационарных токов при потенциалах 0 мВ и −80 мВ показало, что их отношение составляет 0,27 ± 0,07 и 0,12 ± 0,04. Данное различие косвенно свидетельствует о различии потенциалов реверсии. Чтобы точно измерить потенциалы реверсии, необходимо было подобрать внеклеточный и внутриклеточный растворы так, чтобы потенциал реверсии оказался в отрицательном диапазоне значений, где измерения стабильны и надежны. Это было достигнуто за счет применения инвертированных растворов, описанных выше.

* Исследование было выполнено в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

© К. К. Евланенков, 2024

Ответы ASIC2a при разных потенциалах в инвертированных растворах. При потенциале −15 мВ пиковый и стационарный компоненты имеют разную направленность, что прямо свидетельствует о различной ионной селективности

Исследование ответов ASIC2a при разных потенциалах позволило построить вольтамперные кривые обоих компонентов ответа и определить их потенциалы реверсии. Оказалось, что для стационарного компонента ответа потенциал реверсии составляет −14 ± 6 мВ, а для пикового −33 ± 6 мВ. Это означает, что пиковый компонент обладает большей избирательностью для ионов натрия, чем стационарный компонент. Более того, оказалось возможным всегда подобрать такой потенциал, при котором пиковый компонент ответа является выходящим током, а стационарный — входящим (см. рисунок). Это прямое доказательство различной ионной селективности. Различия ионной селективности пикового и стационарного компонентов ответа являются уникальным свойством ASIC2a. У других типов ионных каналов стационарный компонент является недесенситизирующей фракцией пикового ответа и, соответственно, обладает той же ионной селективностью.

Литература

1. Waldmann R. et al. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // Nature. 1997. Vol. 386, No. 6621. P. 173–177.

2. Storozhuk M. et al. Acid-sensing ion channels: focus on physiological and some pathological roles in the brain // Current neuropharmacology. 2021. Vol. 19, No. 9. P. 1570.

3. Hesselager M., Timmermann D. B., Ahring P. K. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits // Journal of Biological Chemistry. 2004. Vol. 279, No. 12. P. 11006–11015.

4. Evlanenkov K. K. et al. Derivatives of 2-aminobenzimidazole potentiate ASIC open state with slow kinetics of activation and desensitization // Frontiers in Physiology. 2023. Vol. 14. P. 1018551.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-234

РОЛЬ M6A-МОДИФИКАЦИЙ РНК В РАЗВИТИИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ *

THE ROLE OF M6A RNA MODIFICATIONS IN THE DEVELOPMENT OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA

К. С. Евменов[1,2], В. В. Володин[1,3], Н. И. Пономарева[1], С. А. Брезгин[1,4], А. С. Тихонов[1,5], И. В. Карандашов[1], Е. О. Баюрова[6], А. Ю. Житкевич[6], И. В. Гордейчук[6], В. П. Чуланов[1,7], Д. С. Костюшев[1,4,8], А. П. Костюшева[1]

[1]*Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России*
[2]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[3]*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*
[4]*Научно-технологический университет «Сириус», Сочи*
[5]*Российский университет дружбы народов, Москва*
[6]*Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М. П. Чумакова РАН, Москва*
[7]*Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний, Москва*
[8]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

K. S. Evmenov[1,2], V. V. Volodin[1,3], N. I. Ponomareva[1], S. A. Brezgin[1,4], A. S. Tikhonov[1,5], I. V. Karandashov[1], E. O. Bayurova[6], A. Y. Zhitkevich[6], I. V. Gordeychuk[6], V. P. Chulanov[1,7], D. S. Kostyushev[1,4,8], A. P. Kostyusheva[1]

[1]*Sechenov First Moscow State Medical University*
[2]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[3]*Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*
[4]*Sirius University of Science and Technology, Sochi*
[5]*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow*
[6]*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products RAS, Moscow*
[7]*National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow*
[8]*Lomonosov Moscow State University*

✉ kevmenov@mail.ru

Аннотация

Эпитранскриптомный анализ профилей m6A-метилирования в биопсиях пациентов с хроническими гепатитами B и D показал наличие дифференциального метилирования сайтов m6A в РНК у пациентов на разных стадиях болезни печени. С помощью направленного m6A-метилирования РНК в исследовании *in vitro* продемонстрировано участие отдельных m6A-сайтов в увеличении онкогенности на двух моделях клеток гепатомы человека.

Abstract

Epitranscriptomic analysis of M6A-methylation profiles in biopsies of patients with chronic hepatitis B and D showed the presence of differentially methylated M6A sites in RNA in patients at different stages of liver disease. Using targeted m6A RNA methylation, an in vitro study demonstrated the involvement of individual sites in increasing cell malignancy in two models of human hepatoma cells.

Метилирование m6A является наиболее распространенной модификацией РНК в эукариотических клетках, частота метилирования составляет ~0,1–0,4 % [1]. Метилирование m6A играет ключевую роль в метаболизме РНК, включая процессы транскрипции, трансляции, деградации и др. Известно, что m6A-метилирование участвует в процессах эмбрионального развития, клеточной дифференцировки, репликации вирусов, а также процессах онкогенеза, опухолевого роста и метастазирования [2].

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-75-10032).

© К. С. Евменов, В. В. Володин, Н. И. Пономарева, С. А. Брезгин, А. С. Тихонов, И. В. Карандашов, Е. О. Баюрова, А. Ю. Кондрашова, И. В. Гордейчук, В. П. Чуланов, Д. С. Костюшев, А. П. Костюшева, 2024

Изменения в m6A-метилировании опухолевых клеток может влиять на клеточный метаболизм, поддерживая гомеостаз тканевой среды и формируя благоприятное микроокружение для более эффективного роста. Использование механизмов метаболической адаптации является важной составляющей высокой выживаемости и агрессивности злокачественных опухолей. Кроме того, известно о влиянии m6A-метилирования на различия в ответе пациентов с онкологическими заболеваниями на противоопухолевые препараты [3]. В этой связи определение m6A-сайтов и уровней их метилирования может использоваться для прогнозирования развития и течения опухолевых заболеваний, а также ответа на применяемую терапию [4].

Целью данной работы было изучение профиля m6A-метилирования РНК у пациентов с хроническим гепатитом B (ХГВ) и B+D (ХГВ+D) и установление корреляций m6A-метилирования с прогрессированием болезни печени. Используя метод полнотранскриптомного MeRIP-секвенирования, был проведен анализ транскриптомных и эпитранскриптомных модификаций РНК в образцах биопсий здоровых доноров и пациентов с ХГВ и ХГВ+D на разных стадиях прогрессии заболевания печени (стадии фиброза печени по шкале METAVIR F0-F4). В результате при прогрессии заболевания от F0 до F4 были обнаружены сотни дифференциально экспрессированных генов и сотни дифференциально представленных сайтов m6A-метилирования.

С помощью системы сайт-направленного m6A-метилирования dCas13-METTL было проведено внесение m6A-меток в 95 сайтов РНК человека, дифференциально представленных у изученных пациентов, и определено влияние m6A-метилирования по одиночным сайтам на пролиферативную активность клеток HepG2. В результате было выявлено 15 сайтов, модификация которых приводила к усилению пролиферации клеток, детектируемой с помощью высокопроизводительной микроскопии. Далее определяли влияние 15 идентифицированных сайтов на миграцию клеток гепатомы человека HepG2 и Huh7. Продемонстрировано, что все идентифицированные сайты усиливали миграцию клеток человека, при этом усиление миграции было воспроизводимо на обеих линиях клеток и достигало 2–4-кратных значений.

В результате впервые идентифицированы дифференциально представленные сайты m6A у пациентов с ХГВ и ХГВ+D и показана про-онкогенная роль выявленных сайтов на моделях клеток гепатомы человека HepG2 и Huh7.

Литература

1. Sun T., Wu R., Ming L. The role of m6A RNA methylation in cancer // Biomed Pharmacother. 2019. Vol. 112. P. 108613.

2. Gilbert W.V., Bell T.A., Schaening C. Messenger RNA modifications: Form, distribution, and function // Science. 2016. Vol. 352 (6292). P. 1408–1412.

3. Han D., Liu J., Chen C. et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m6A methylation and YTHDF1 in dendritic cells. Nature. 2019. Vol. 566 (7743). P. 270–274.

4. An Y., Duan H. The role of m6A RNA methylation in cancer metabolism // Mol. Cancer. 2022. Vol. 21 (1). P. 14.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-235

ОЦЕНКА ТИПА АКТИВАЦИИ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *IN VITRO* *

ASSESSMENT OF THE ACTIVATION TYPE OF GLIAL CELLS AND THE STATE OF MITOCHONDRIA IN ALZHEIMER'S DISEASE MODELING *IN VITRO*

А. А. Ермошина, А. Д. Охальников, А. О. Моторина, М. С. Гавриш, А. А. Бабаев

Научно-исследовательский институт нейронаук,
Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского

A. A. Ermoshina, A. D. Okhalnikov, A. O. Motorina, M. S. Gavrish, A. A. Babaev

Research Institute of Neurosciences, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod

✉ ermoshina.aa@yandex.ru

Аннотация

Болезнь Альцгеймера — наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание. По новым данным, митохондрии принимают активное участие в патогенезе болезни Альцгеймера, при этом в органоидах накапливаются нарушения. Считается, что есть связь между накоплением дефектов митохондрий и воспалением. Нами было проведено исследование типа активации глиальных клеток, оценка паттернов экспрессии структурных митохондриальных генов, генов ауто- и митофагии.

Abstract

Alzheimer's disease is the most common neurodegenerative disease. According to new data, mitochondria are actively involved in the pathogenesis of Alzheimer's disease, while disorders accumulate in organoids. It is believed that there is a link between the accumulation of mitochondrial defects and inflammation. We conducted a study of the type of glial cell activation, evaluation of the expression patterns of structural mitochondrial genes, auto- and mitophagy genes.

Болезнь Альцгеймера — наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, численность больных составляет около 47,5 млн человек во всем мире. В настоящее время все большую популярность приобретает теория митохондриального каскада. При этом считается, что дисфункция митохондрий сильно связана с воспалительными процессами, которые возникают еще на ранних стадиях болезни.

Цель работы — оценить состояние глиальных клеток посредством оценки уровня экспрессии ряда генов, ответственных за воспаление и состояние митохондрий при моделировании болезни Альцгеймера *in vitro*.

В качестве экспериментальной модели были выбраны мыши линии 5xFAD. Мыши 5xFAD экспрессируют человеческие белки APP и PSEN1 с пятью мутациями, связанными с ускоренным амилоидозом, под контролем промотора Thy1.2. Носители обоих трансгенов были отнесены в опытную группу FAD, в качестве контроля выступали мыши линии 5xFAD, не несущие трансгенов, — группа WT.

Для проведения экспериментов использовали первичные смешанные глиальные культуры коры головного мозга, полученные от новорожденных (P0–P2) мышей линии 5xFAD, предварительно разделенные на экспериментальные группы по результатам генотипирования — носители обоих трансгенов APP и PSEN1 были отнесены в опытную группу FAD, в качестве контроля выступали мыши линии 5xFAD, не несущие трансгенов — группа WT. На 14, 21 и 28-й дни культивирования (DIV) проводилось выделение тотальной РНК из культур для дальнейшего анализа с помощью ПЦР в режиме реального времени. Обработку результатов проводили с использованием метода ΔΔCt и референсного гена, кодирующего антизим орнитиндекарбоксилазу 1 (oaz1). Статистическая обработка проводилась при помощи GraphPad Prism.

При анализе динамики экспрессии генов противовоспалительных цитокинов были выявлены статистически значимые различия в виде повышения уровня экспрессии гена il10 в группе FAD (21, 28 DIV) и снижения уровня экспрессии гена il4 в группе FAD на 28 DIV, гена рецептора trem2 в группе WT (21, 28 DIV). Между уровнями мРНК провоспалительных генов в группах FAD, WT и 14 DIV не было выявлено статистически значимых различий.

Был сделан вывод, что в смешанной глиальной культуре в группе FAD не произошло предполагаемого переключения профиля экспрессии на воспалительный. Возможно, это связано с тем, что нами рассматривалась

© А. А. Ермошина, А. Д. Охальников, А. О. Моторина, М. С. Гавриш, А. А. Бабаев, 2024

смешанная культура. В целом она несет в себе несколько типов клеток, каждый из которых мог по-разному ответить на процессы, происходящие при моделировании болезни Альцгеймера.

В рамках эксперимента оценивали уровни экспрессии митохондриальных структурных генов drp1, opa1 и mfn2, аутофагических генов sqstm1 и lc3b и митофагического гена pink1 в смешанных глиальных культурах на 14, 21 и 28 DIV.

Можно отметить изменение профиля экспрессии в группе FAD на 28 DIV: происходит снижение уровня экспрессии гена drp1 (напрямую влияет на частоту делений митохондрий) и повышение уровня экспрессии гена mfn2 (влияет на частоту слияний митохондрий). Соответственно, подобные изменения позволяют предположить, что митохондрии в опытной группе чаще сливаются и реже делятся, чем в контрольной. На основании литературных данных наблюдаемые изменения можно связать с присутствием в среде Aβ, который увеличивает активность белка DRP1. Повышение уровня Mfn2 в некоторых исследованиях отмечалось как характерная черта для начальной стадии болезни Альцгеймера. Следовательно, подобные результаты могут отображать начало патологических процессов в модели болезни Альцгеймера.

Таким образом, при моделировании болезни Альцгеймера не выявлено воспалительных процессов в смешанной глиальной культуре на исследуемых сроках культивирования. Уровень экспрессии гена drp1 на 28 DIV снизился в 1,88 раза, а уровень экспрессии гена mfn2 увеличился в 2,39 раза по сравнению с уровнем экспрессии этих генов в группе FAD на 14 DIV, что является показателями ранних процессов, предшествующих патологическим.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-236

АНТИДЕПРЕССАНТ ВОРТИОКСЕТИН ИНГИБИРУЕТ ИОНОТРОПНЫЕ ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ NMDA-ТИПА *

ANTIDEPRESSANT VORTIOXETINE INHIBITS NMDA TYPE IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS

А. С. Жигулин, О. И. Барыгин

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

A. S. Zhigulin, O. I. Barygin

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ arseniy.zhigulin@yandex.ru

Аннотация

Вортиоксетин — относительно недавно одобренный антидепрессант с мультимодальным фармакологическим профилем. В данной работе впервые демонстрируется способность вортиоксетина ингибировать ионотропные глутаматные рецепторы NMDA-типа.

Abstract

Vortioxetine is a relatively recently approved antidepressant with a multimodal pharmacological profile. This work demonstrates for the first time the ability of vortioxetine to inhibit NMDA type ionotropic glutamate receptors.

Вортиоксетин — относительно недавно одобренный антидепрессант с мультимодальным фармакологическим профилем [1]. Основными мишенями вортиоксетина являются серотониновые рецепторы и транспортеры. Известно, что многие классические антидепрессанты (флуоксетин, дезипрамин, амитриптилин и др.) помимо своего основного действия способны ингибировать ионотропные глутаматные рецепторы NMDA-типа [2–4], а изменения в глутаматергической системе напрямую задействованы в патофизиологии депрессии [5]. Более того, за последние несколько лет два антагониста NMDA-рецепторов — кетамин и декстрометорфан — были одобрены для лечения депрессии, что еще больше усилило интерес к данной области исследований. Вортиоксетин ранее не проверялся на активность по отношению к NMDA-рецепторам, и мы решили восполнить этот пробел в данной работе.

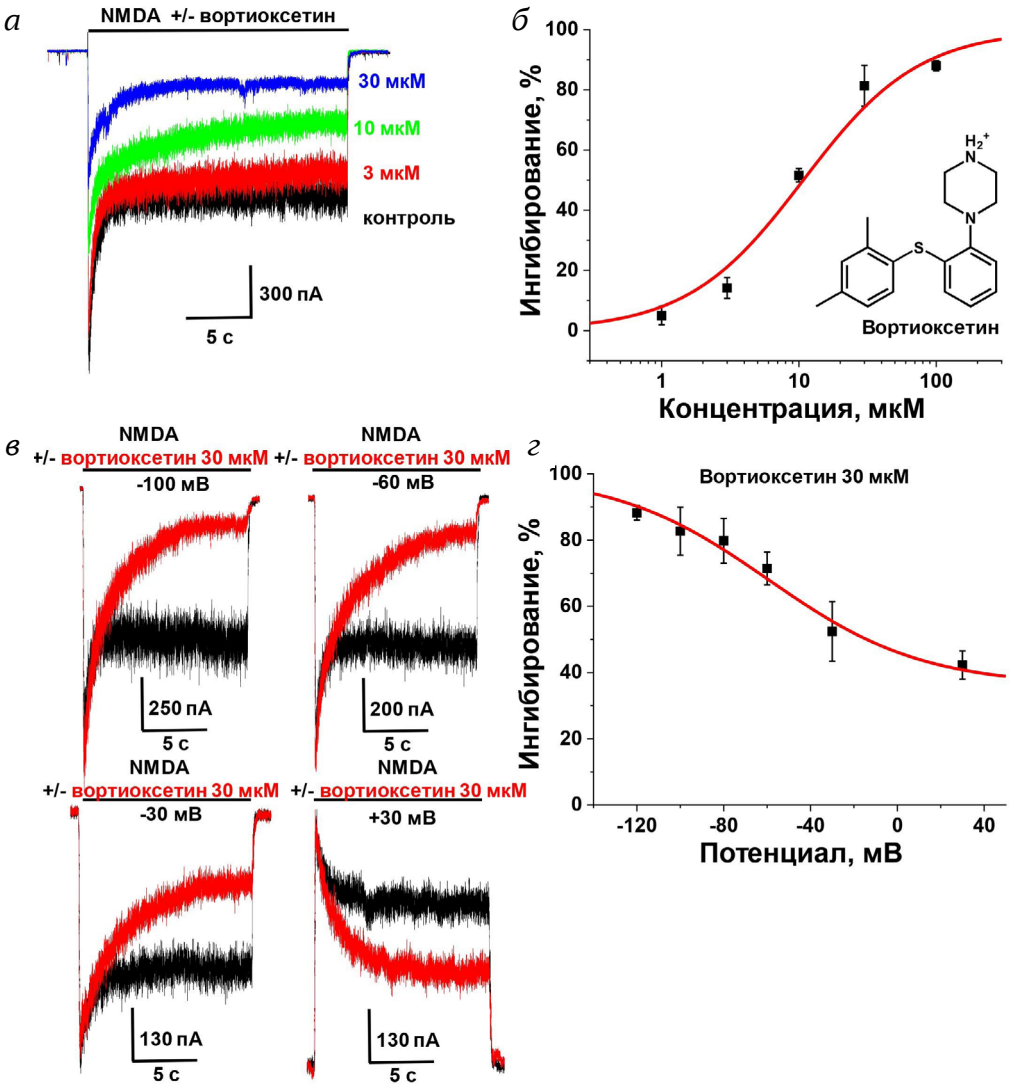
Эксперименты проводились на изолированных пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа крыс линии Вистар (13–18 дней). Изоляция нейронов из срезов осуществлялась методом вибродиссоциации [6]. Для регистрации трансмембранных токов применяли метод фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка». Данные о действии вортиоксетина представлены в виде среднее ± стандартное отклонение на основе как минимум 4 экспериментов. Статистическая значимость эффектов анализировалась с помощью t-тестов. NMDA рецепторы активировались с помощью NMDA (100 мкМ) и глицина (10 мкМ). Регистрация NMDA-вызванных трансмембранных токов осуществлялась при фиксированном потенциале −80 мВ.

Аппликация внеклеточного раствора, содержащего NMDA (100 мкМ) и глицин (10 мкМ), вызывала входящие токи через NMDA-рецепторы с величиной стационарного компонента ~ 200–1000 пА. Аппликация вортиоксетина (1–100 мкМ) вызывала обратимое ингибирование стационарной компоненты тока (см. рисунок, *а*). Концентрационная зависимость действия вортиоксетина на NMDA рецепторы при потенциале −80 мВ представлена на рисунке, *б*. С помощью аппроксимации данных уравнением Хилла были получены значение $ИК_{50}$ и коэффициент Хилла, равные 11 ± 1 мкМ и 1,3 ± 0,2 соответственно (n = 5). Молекула вортиоксетина является монокатионом при pH 7,4 (см. рисунок, *б*). Наличие заряженной группы позволяет оценить расположение сайта связывания молекулы относительно электрического поля мембраны. Для этого мы исследовали зависимость ингибирующего действия вортиоксетина (30 мкМ) от потенциала на мембране в диапазоне от −120 до +30 мВ. Репрезентативные примеры ингибирования NMDA рецепторов вортиоксетином при различных фиксированных потенциалах представлены на рисунке, *в*. Ингибирующий эффект вортиоксетина возрастал при гиперполяризации, что говорит о наличии потенциал-зависимого компонента действия, харак-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

© А. С. Жигулин, О. И. Барыгин, 2024

терного для блокаторов открытого канала. При деполяризации эффект спадал, но оставался значительным даже при потенциале +30 мВ, что говорит также о наличии потенциал-независимого компонента действия. Данные потенциал-зависимости действия вортиоксетина на NMDA-рецепторы представлены на рисунке, *г*. Аппроксимация данных с помощью модели Вудхалл, учитывающей наличие потенциал-независимого компонента [7], позволила рассчитать значение δ, характеризующее относительную глубину сайта связывания молекулы в поре канала, равное 0,7 ± 0,1. Полученное значение хорошо соотносится с представлениями о расположении сайта связывания известных каналоблокаторов NMDA-рецепторов [8]. При этом наличие потенциал-независимого компонента говорит о наличии еще одного сайта связывания, находящегося вне поры канала. Аффинность к этому сайту (K_{vi}) оказалась равна 53 ± 14 мкМ, что лишь немного больше значения $ИК_{50}$, рассчитанного при −80 мВ. Аффинность к канальному сайту (K_{vd}), напротив, оказалась значительно выше (160 ± 90 мкМ). Таким образом, действие вортиоксетина по сайту вне поры канала дает весомый вклад в его общую активность. Для более полного представления о молекулярных механизмах действия вортиоксетина на NMDA-рецепторы необходимы дальнейшие исследования. Уже полученные результаты позволяют предположить, что ингибирование NMDA-рецепторов вортиоксетином может вносить вклад в его терапевтический профиль и побочные эффекты.



Зависимость действия вортиоксетина на NMDA-рецепторы от концентрации и мембранного потенциала: репрезентативные примеры ингибирования NMDA-рецепторов различными концентрациями вортиоксетина (*а*) и кривая концентрационной зависимости (*б*) при фиксированном потенциале −80 мВ; репрезентативные примеры ингибирования NMDA-рецепторов вортиоксетином (30 мкМ) при различных потенциалах (*в*) и кривая потенциал-зависимости (*г*)

Литература

1. Sanchez C., Asin K. E., Artigas F. Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data // Pharmacology & therapeutics. 2015. Vol. 145. P. 43–57.

2. Tohda M., Urushihara H., Nomura Y. Inhibitory effects of antidepressants on NMDA-induced currents in Xenopus oocytes injected with rat brain RNA // Neurochemistry international. 1995. Vol. 26 (1). P. 53–58.

3. Szasz B. K., Mike A., Karoly R. et al. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system // Biological psychiatry. 2007. Vol. 62 (11). P. 1303–1309.

4. Barygin O. I., Nagaeva E. I., Tikhonov D. B. et al. Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics // Brain Research. 2017. Vol. 1660. P. 58–66.

5. Hanson J. E., Yuan H., Perszyk R. E. et al. Therapeutic potential of N-methyl-D-aspartate receptor modulators in psychiatry // Neuropsychopharmacology. 2024. Vol. 49 (1). P. 51–66.

6. Vorobjev V. S. Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue // Journal of neuroscience methods. 1991. Vol. 38 (2-3). P. 145–150.

7. Zhigulin A. S., Barygin O. I. Mechanisms of NMDA Receptor Inhibition by Sepimostat-Comparison with Nafamostat and Diarylamidine Compounds // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24 (21). P. 15685.

8. Bolshakov K. V., Gmiro V. E., Tikhonov D. B., Magazanik L. G. Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels // Journal of Neurochemistry. 2003. Vol. 87 (1). P. 56–65.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-237

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧИСЛА КОПИЙ ТРАНСГЕННОЙ КАССЕТЫ У МЫШЕЙ ЛИНИИ FUS(1-359) *

COMPARATIVE ANALYSIS OF TRANSGENE COPY NUMBER IN FUS(1-359) MOUSE LINE

Н. С. Жунусов, А. А. Курбатова, П. Р. Лебедев, С. А. Кушнир, А. А. Авраменко, М. В. Покровский

Белгородский государственный национальный исследовательский университет

N. S. Zhunusov, A. A. Kurbatova, P. R. Lebedev, S. A. Kushnir, A. A. Avramenko, M. V. Pokrovsky

Belgorod State National Research University

✉ nzhunusov29@gmail.com

Аннотация

Относительный и абсолютный анализ числа копий трансгенной кассеты животных, представляющих собой генетические модели широкого спектра наследственных заболеваний, достиг принципиально нового уровня благодаря переходу от метода саузерн-блот-анализа к (полу-)количественной ПЦР в реальном времени (qPCR) с использованием интернализующих красителей или флуоресцентных зондов. Тем не менее качество данного вида анализа может ухудшаться ввиду ненадлежащей статистической обработки данных, а также неверной субъективной интерпретации неоднозначных результатов. Это, в свою очередь, может привести к ошибочной количественной оценке копийности и фенотипизации трансгенных животных моделей. В связи с этим представляется важным выбор правильного подхода к статистической обработке и дизайну проведения высокоточной оценки количества копий анализируемой нуклеотидной последовательности.

Abstract

Relative and absolute copy number analysis of transgenic cassettes in animals serving as genetic models for a wide range of hereditary diseases has reached a new level of precision due to the transition from Southern blot analysis to (semi-)quantitative real-time PCR (qPCR) using intercalating dyes or fluorescent probes. However, the quality of this type of analysis can be compromised by inadequate statistical data processing and subjective misinterpretation of ambiguous results. This, in turn, can lead to erroneous quantification of copy number and phenotypic characterization of transgenic animal models. Therefore, it is crucial to select the appropriate statistical approach and experimental design for highly accurate quantification of the copy number of the analyzed nucleotide sequence.

Трансгенные линии животных широко распространяются в медико-биологической сфере исследований заболеваний человека с целью изучения молекулярно-генетических основ развивающихся наследственных патологий [1]. Результаты этого направления способствуют методическим разработкам эффективной профилактики, персонализированной терапии и высокоточной диагностики множества самых распространенных (нейромышечных, нейродегенеративных, заболеваний крови, новообразований), а также орфанных наследственных заболеваний.

Создание генетических моделей путем редактирования генома животных с использованием методов нетаргетного встраивания трансгенной последовательности в виде тандемных повторов представляет собой один из самых первоочередных способов получения организмов — моделей заболеваний человека, гиперэкспрессирующих патологические белки [2, 3].

Для молекулярно-генетического описания получаемых первичных трансгенов и их потомков необходимо проводить точную оценку числа копий встроенного трансгена, позволяющую провести взаимосвязь между эффективностью встраивания чужеродной последовательности в геном животного и проявляемыми фенотипическими признаками, скоррелированными с клиническими проявлениями у человека.

Цель исследования — сравнительный анализ числа копий трансгенной кассеты у мышей линии Fus(1-359).

Материалы и методы. Животные. Fus(1-359) — линия генно-модифицированных мышей на аутбредном бэкграунде CD-1, полученных путем внедрения фрагмента человеческой кДНК FUS 1-359 с помощью плазмидного вектора [4], экспрессирующих патологический вариант белка Fused in sarcoma с высокой предрасположенностью к агрегации в моторных нейронах. Животные были получены из ИФАВ РАН.

В анализ были включены 6 трансгенных гомозиготных самцов, 6 трансгенных гемизиготных самцов (n = 12), а также 3 самца дикого типа (n = 3).

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2021-1346, и гранта ФНТП № 075-15-2021-1346.

© Н. С. Жунусов, А. А. Курбатова, П. Р. Лебедев, С. А. Кушнир, А. А. Авраменко, М. В. Покровский, 2024

ПЦР-анализ в реальном времени проводился с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), включал в себя анализ целевого фрагмента Fus(1-359) в сравнении с 4 генами домашнего хозяйства с известной копийностью в мышином геноме Gapdh (102 копии), H3c7 (18 копий), Hba1 (4 копии), Hprt1 (самцы — 1 копия, самки — 2 копии). Все образцы были поставлен в 3 повторностях на каждую реакцию с 5 парами праймеров. Содержание очищенной ДНК в реакционной смеси составляло 40 нг.

Дизайн праймеров и параметры амплификации были выполнены с учетом использования единого протокола амплификации на оборудовании CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad lab. Inc., США).

Результаты. Расчет проводился с использованием логарифмической регрессионной модели по формуле:

$$y = b \times Ln(x) + a,$$

где y — переменная ответа (Ct); x — предикторная переменная (количество копий фрагмента); a, b — коэффициенты регрессии.

Результаты расчетов представлены на рис. 1 и 2.

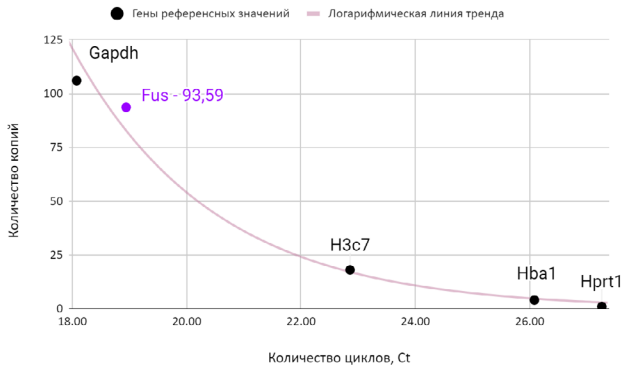


Рис. 1. График логарифмической регрессионной модели для подсчета количества копий трансгена у гомозиготных животных, $y = -2{,}008 \times Ln(x) + 28{,}057$

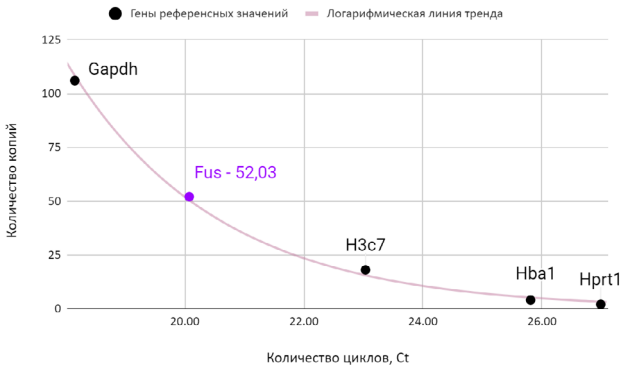


Рис. 2. График логарифмической регрессионной модели для подсчета количества копий трансгена у гемизиготных животных, $y = -2{,}217 \times Ln(x) + 28{,}834$

Как видно из полученных данных, сравнение результатов анализа образцов животных самцов представленных генотипов показывает различия в числе копий трансгенной кассеты в 1,799 раза, что соответствует результатам генотипирования животных методом полуколичественной ПЦР в реальном времени, а также фенотипическим проявлением заболевания.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения представленного способа анализа целевого фрагмента относительно референсных значений с целью быстрого определения точного количества числа копий трансгенной кассеты животных моделей, необходимого для правильной оценки корреляции фенотип-генотип.

Литература

1. Shakweer W. M. E., Krivoruchko A. Y., Dessouki S. M., Khattab A. A. A review of transgenic animal techniques and their applications // J. Genet. Eng. Biotechnol. 2023. Vol. 21 (1). P. 55.

2. Leonova E. I., Reshetnikov V. V., Sopova J. V. CRISPR/Cas-edited pigs for personalized medicine: more than preclinical test-system // Research Results in Pharmacology. 2022. Vol. 8 (3). P. 87–98.

3. Shelkovnikova T. A., Peters O. M., Deykin A. V. et al. Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice // The Journal of Biological Chemistry. 2013 Vol. 288 (35). P. 25266–25274.

4. Deĭkin A. V., Kovrazhkina E. A., Ovchinnikov R. K. et al. A mice model of amyotrophic lateral sclerosis expressing mutant human FUS protein // Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova. 2014. Vol. 114 (8). P. 62–69.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-238

ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ КОМБИНАЦИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С МИТРАМИЦИНОМ А ДЛЯ ТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗОВ*

EFFECTIVE COMBINATIONS OF ANTITUMOUR DRUGS WITH MITHRAMYCIN A FOR LEUKAEMIA THERAPY

К. А. Иваненко, Т. Д. Лебедев, В. С. Прасолов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

K. A. Ivanenko, T. D. Lebedev, V. S. Prasolov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ karina.ivanenko@mail.ru

Аннотация

Фактор транскрипции Sp1 может регулировать экспрессию генов в клетках некоторых злокачественных заболеваний. В данной работе мы изучали возможность совместного использования предполагаемого ингибитора транскрипционной активности Sp1 — митрамицина А — с ингибиторами разных классов в отношении перевиваемых клеток лейкоза человека.

Abstract

Transcription factor Sp1 can regulate gene expression in the cells of some malignant diseases. In this study, we explored the possibility of combining the proposed inhibitor of the transcriptional activity of Sp1 (mithramycin A) with inhibitors of different classes in relation to human leukemia cell lines.

Актуальность. Лейкоз — группа злокачественных заболеваний, возникающая в результате трансформации незрелых клеток крови. Для клеток лейкоза возможны мутации в генах, кодирующих факторы транскрипции. Sp1 — фактор транскрипции, активность которого повышена в лейкозных клетках. Существует предполагаемый ингибитор транскрипционной активности Sp1 — митрамицин А, но его применение ограничено из-за высокой токсичности.

Цель — изучить совместное действие митрамицина А и противоопухолевых препаратов для терапии лейкозов.

Материалы и методы. Мы использовали перевиваемые клетки лейкоза человека HL-60, K562, MV4;11. Для выявления генов рецепторных тирозинкиназ, коррелирующих с зависимостью от активности Sp1, мы провели анализ базы данных DepMap. Изменение уровня мРНК генов определяли методом ПЦР в реальном времени. Анализ изменения потенциала митохондрий, активности лизосом и количества Fe(II) проводили методом проточной цитометрии (BD, Fortessa) после инкубирования клеток с препаратом в течение 72 ч и окрашивания красителями TMRE, LysoGreen, HMRhoNox соответственно. Для подбора противоопухолевых препаратов мы проанализировали чувствительность клеток к препаратам после подавления в них Sp1 по базе данных DepMap. Синергический эффект комбинаций препаратов был оценен на 6-й день совместного инкубирования с клетками с использованием красителя резазурина.

Результаты. В клетках MV4;11, обработанных митрамицином А, уровень мРНК генов рецепторных тирозинкиназ увеличивался, а в клетках K562 — снижался. Для всех протестированных клеток лейкоза мы наблюдали уменьшение активности митохондрий, другие же эффекты между линиями различаются. Совместное использование митрамицина А и нинтеданиба, энтиностата, третиноина синергически снижает пролиферацию клеток лейкоза K562, MV4;11, HL-60 соответственно.

Выводы. Митрамицин А усиливает цитотоксическое действие ряда ингибиторов в отношении клеток миелоидного лейкоза, что может быть использовано для разработки нового эффективного терапевтического подхода для лечения.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-74-10103).

© К. А. Иваненко, Т. Д. Лебедев, В. С. Прасолов, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-239

АНАЛИЗ РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР В ДОРМАНТНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТКАХ

CANDIDATE REFERENCE GENE ANALYSIS FOR NORMALIZATION OF QRT-PCR DATA IN DORMANT CANCER CELLS

Э. Р. Исхакова, И. И. Суворова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E. R. Iskhakova, I. I. Suvorova

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg

✉1808elina@gmail.com

Аннотация

Блокирование киназы mTOR приводит к уменьшению размеров опухолей и к появлению дормантных раковых клеток. Ингибирование mTOR является основой получения дормантных клеток *in vitro*. В данной работе были продемонстрированы внутриклеточные различия между раковыми клетками в норме и в состоянии дормантности при действии AZD8055, а затем оценены 12 генов-кандидатов с целью найти наиболее релевантный референсный ген для нормализации данных количественной ПЦР.

Abstract

Blockage of mTOR kinase leads to a decrease in tumor size and to the appearance of dormant cancer cells. Inhibition of mTOR is the basis for obtaining dormant cells *in vitro*. In this study, we demonstrated intracellular differences between normal and dormant cancer cells under the effect of AZD8055, and then evaluated 12 candidate genes to find the most relevant reference gene for normalization of quantitative PCR data.

Клинически подтверждено, что рецидив онкологических заболеваний обуславливается возобновлением активности дормантных раковых клеток — непролиферирующих раковых клеток, которые обратимо останавливаются в фазе клеточного цикла G1/G0 [3]. Дормантные раковые клетки характеризуются супрессией киназы mTOR, а ингибирование mTOR — это способ получения дормантных опухолевых клеток *in vitro* [1, 2]. Прежде чем приступить к изучению их генной экспрессии, необходимо удостовериться в наличии подходящих референсных генов для нормализации данных количественной ПЦР, так как использование непригодного референсного гена может привести к ошибочной интерпретации данных.

С помощью иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитометрии было выяснено, что после обработки раковых клеток ингибитором mTOR AZD8055 происходит уменьшение размера клетки и ядра (рис. 1).

Далее была оценена их способность формировать сфероиды, что является тестом на злокачественность. При концентрации ингибитора 0,5 мкМ (рис. 2) эффективность образования сфероидов равна 100 %, значит, клетки сохраняют злокачественный потенциал, но единой тенденции к увеличению или уменьшению размера сфероидов со временем нет. При концентрации AZD8055 10 мкМ большинство клеток образуют сфероиды с 100%-й эффективностью, но их размер значительно меньше, чем в контроле (см. рис. 2). Учитывая, что ингибитор в этой концентрации вносит более выраженный эффект в глубину покоя, а клетки остаются жизнеспособными и злокачественными, было решено обрабатывать клетки ингибитором mTOR в концентрации 10 мкМ.

Референсные гены должны характеризоваться минимальной изменчивостью и высоким уровнем экспрессии. Из числа широко используемых референсных генов нами были выбраны 12 генов-кандидатов, которые участвуют в поддержании базовых клеточных функций: синтез белка (*rpl13a, rps18, rps23, ywhaz, tbp, eif2b1*), формирование цитоскелета (*actb, tuba1a*), метаболизм (*gapdh, pgk1, cyc1*), иммунопрезентация (*b2m*). На основе кПЦР были получены значения Ct генов-кандидатов в клетках опухолевых линий A549, T98G, PA-1 в норме и после обработки AZD8055 в течение 1 недели. Эти гены экспрессируются на высоком уровне, то есть удовлетворяют одному из требований к референсному гену.

Далее была проведена оценка релевантности референсных генов с помощью различных статистических алгоритмов. Сначала для средних значений Ct были рассчитаны значения коэффициента вариации (CV). Однако низкое значение коэффициента вариации может быть вызвано случайным событием, поэтому мы использова-

© Э. Р. Исхакова, И. И. Суворова, 2024

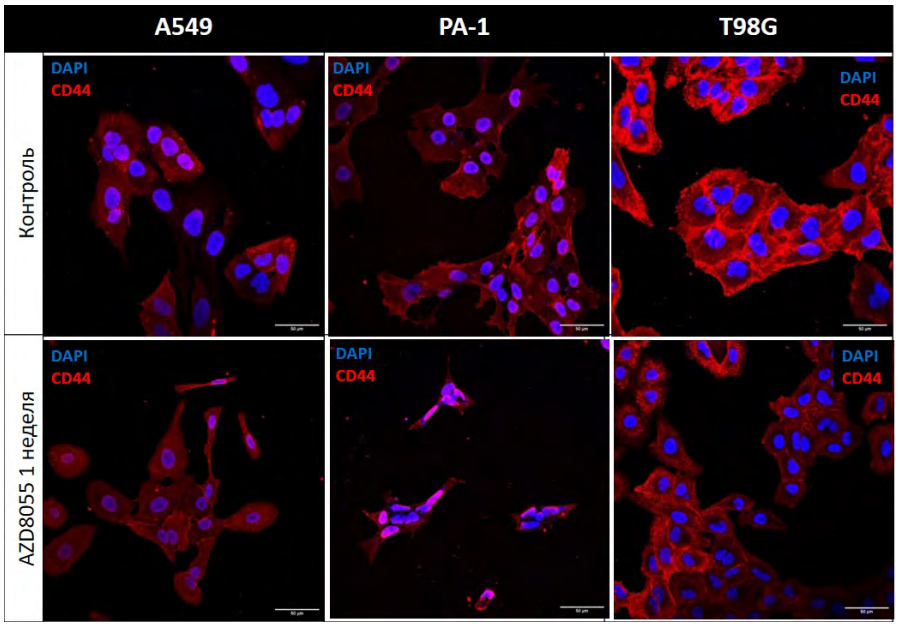


Рис. 1. Окрашивание антителами против CD44 в контрольных и обработанных ингибитором AZD8055 (10 мкМ, 1 неделя) клетках

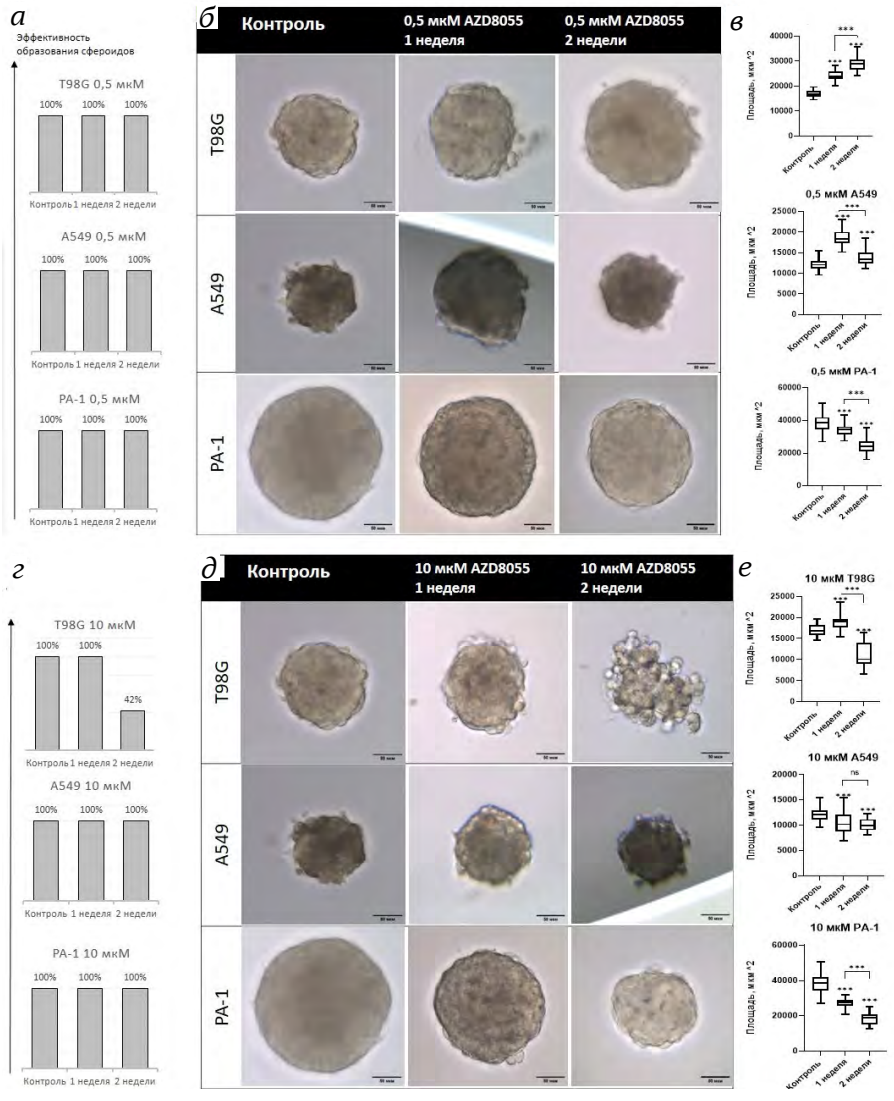


Рис. 2. Влияние ингибитора AZD8055 в концентрации 5 мкМ (*а–в*) и 10 мкМ (*г–е*) на злокачественность раковых клеток: *а, г* — графики эффективности образования; *б, д* — изображения сфероидов, образованных из клеток линий T98G, A549 и PA-1 под воздействием ингибитора AZD8055; *в, е* — диаграмма распределения размеров сфероидов

ли и дополнительные статистические алгоритмы. В инструменте NormFinder используется математическая модель, оценивающая внутригрупповую и межгрупповую вариацию пороговых значений цикла, и для каждого гена определяется «значение стабильности» (SV). Программа не позволяет наличию совместно регулируемых генов с высокими значениями корреляции внести ошибки. BestKeeper считает стандартное отклонения значений Ct для каждого гена отдельно, а в сравнительном методе ΔCt значения Ct для каждого гена сравниваются попарно. Программа geNorm определяет попарное стандартное отклонение значений Ct для всех комбинаций генов, а затем исключает ген наименьшей стабильностью.

На основе анализа перечисленными алгоритмами мы разбили референсные гены-кандидаты на три группы в зависимости от стабильности экспрессии. Однозначно можно сказать, что гены *actb, rps18, rpl13a, rps23* являются непригодными референсами, так как они проявили нестабильность экспрессии в результате расчетов во всех трех клеточных линиях. Методом исключения был определен ген, который в рейтингах всех статистических алгоритмов всех клеточных линий всегда занимает высокие места, — *ywhaz*. Он проявляет стабильность экспрессии, следовательно, подходит для нормализации кПЦР в дормантных раковых клетках. Остальные гены были отнесены в группу пригодных, но тканеспецифических референсных генов, которые не рекомендуется использовать в качестве референсов без предварительной проверки на конкретной опухолевой линии.

Литература

1. Aguirre-Ghiso J.A. Translating the Science of Cancer Dormancy to the Clinic // Cancer Research. 2021. Vol. 18 (81). P. 4673–4675.

2. Aleksandrova K.V., Vorobev M.L., Suvorova I.I. mTOR pathway occupies a central role in the emergence of latent cancer cells // Cell Death & Disease. 2024. Vol. 2 (15). P. 1–11.

3. Naumov G.N. et al. Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases // Breast Cancer Research and Treatment. 2003. Vol. 3 (82). P. 199–206.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-240

НОВЫЙ МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ *

A NEW METHOD FOR THE MOLECULAR GENETIC TYPING OF THE CAUSATIVE AGENT OF GONOCOCCAL INFECTION

И. Д. Кандинов, Б. Л. Шаскольский, А. А. Ларкин, Д. В. Кравцов, Д. А. Грядунов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

I. D. Kandinov, B. L. Shaskolskiy, A. A. Larkin, D. V. Kravtsov, D. A. Gryadunov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ ilya9622@gmail.com

Аннотация

Глобальная проблема лекарственной устойчивости возбудителя гонококковой инфекции *Neisseria gonorrhoeae* требует совершенствования схем молекулярного типирования, пригодных для быстрого и массового скрининга. Целью настоящего исследования являлась разработка и апробация нового метода молекулярно-генетического типирования *N. gonorrhoeae* на основе отечественной технологии гидрогелевых олигонуклеотидных микрочипов.

Abstract

The global problem of drug resistance of the gonococcal pathogen *Neisseria gonorrhoeae* necessitates the improvement of molecular typing schemes that are suitable for rapid and mass screening. The objective of the study was to develop and validate a new method of molecular genetic typing of *N. gonorrhoeae* based on domestic technology of hydrogel oligonucleotide microarrays.

Гонорея — это инфекционное заболевание, передающееся половым путем, которое признано Всемирной организацией здравоохранения серьезной угрозой репродуктивному здоровью населения [1]. Одной из причин появления опасных генотипов возбудителя гонококковой инфекции *N. gonorrhoeae* в России является трансграничный перенос изолятов из других стран [2]. На фоне мирового роста устойчивости *N. gonorrhoeae* к актуальным антимикробным препаратам Россия уже в ближайшем будущем неизбежно столкнется с неэффективностью современных схем терапии и ростом заболеваемости.

Современные методы генотипирования *N. gonorrhoeae*, с помощью которых ведется непрерывный мониторинг за распространением резистентных штаммов, являются несовершенными. Multilocus Sequence Typing (MLST) — широко применяемый метод для молекулярно-генетического типирования *N. gonorrhoeae* [3]. Для MLST-генотипирования используются высококонсервативные, медленно эволюционирующие гены, последовательности которых для большинства бактерий, включая *Neisseria sP.*, представлены в базе данных PubMLST (https://pubmlst.org/). Секвенируют последовательности в основном по Сэнгеру, редко с использованием современных методов высокопроизводительного секвенирования, что является весьма трудоемким и дорогостоящим для рутинного генотипирования клинических изолятов *N. gonorrhoeae* и создает предпосылки для разработки новых подходов к молекулярно-генетическому типированию *N. gonorrhoeae*, пригодных для быстрого и массового скрининга.

Проанализировано 21 402 генома изолятов с известными MLST-генотипами из базы данных PubMLST. Используя последовательности семи высококонсервативных генов домашнего хозяйства, выявлено восемнадцать информативных полиморфизмов, составивших нуклеотидные профили (mini-MLST) для предсказания MLST-генотипов изолятов. На основе mini-MLST предложена новая система группировки отдельных сиквенс-типов в генетические группы (геногруппы). Проведенный филогенетический анализ глобальной популяции *N. gonorrhoeae* с учетом MLST-геногрупп показал, что бóльшая часть сиквенс-типов, включенных в одну геногруппу, расположены филогенетически близко, а каждая геногруппа, как правило, занимает большую часть соответствующей клады. Таким образом, MLST-геногруппы являются стабильной характеристикой глобальной популяции *N. gonorrhoeae* и могут использоваться для популяционно-генетических исследований.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 4-25-20084).

© И. Д. Кандинов, Б. Л. Шаскольский, А. А. Ларкин, Д. В. Кравцов, Д. А. Грядунов, 2024

Анализ наиболее распространенных в мире генетических групп показал, что предложенная нами схема группировки MLST объединяет изоляты, близкие по чувствительности к антимикробным препаратам [4]. В частности, изоляты из геногруппы G1901 больше всего ассоциированы со снижением чувствительности к цефалоспоринам III поколения из-за наличия мозаичной аллелей гена *penA*, в основном XXXIV типа. Изоляты из геногруппы G9363 ассоциированы с устойчивостью к азитромицину, как правило, в силу наличия мутаций в гене 23S rRNA, реже из-за мозаичного оперона *mtrCDE*.

Разработаны и размещены онлайн (https://minimlst.su/) алгоритмы предсказания молекулярных типов изолятов по схеме типирования mini-MLST. Созданная схема mini-MLST типирования *N. gonorrhoeae* реализована в методе определения/предсказания MLST-генотипов на основе гидрогелевого ДНК-микрочипа. Отличительной особенностью микрочипа является возможность одновременного определения всех восемнадцати информативных полиморфизмов, что существенно сокращает время анализа. Апробация метода на российских клинических изолятах показала высокую предсказательную способность с точностью до MLST-геногруппы. Таким образом, созданный метод молекулярного типирования гонококка на основе анализа восемнадцати информативных полиморфизмов является простой и экономически эффективной альтернативой существующим схемам генотипирования и позволяет существенно упростить массовый эпидемиологический скрининг *N. gonorrhoeae*.

Литература

1. WHO. Enhanced Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme (EGASP): Surveillance Report 2022.

2. Kandinov I. D., Dementieva E. I., Filippova M. A. et al. Emergence of Azithromycin-Resistant *Neisseria gonorrhoeae* Isolates Belonging to the NG-MAST Genogroup 12302 in Russia // Microorganisms. 2023. Vol. 11. P. 1226.

3. Maiden M. C., Jansen van Rensburg M. J., Bray J. E. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics // Nat. Rev. Microbiol. 2013. Vol. 11. P. 728–736.

4. Thomas J. C., Joseph S. J., Cartee J. C. et al. Phylogenomic analysis reveals persistence of gonococcal strains with reduced-susceptibility to extended-spectrum cephalosporins and mosaic penA-34 // Nat. Commun. 2021. Vol. 12. P. 3801.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-241

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА *MAMMARENAVIRUS JUNINENSE* НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ RPA*

DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC SYSTEM FOR *MAMMARENAVIRUS JUNINENSE* VIRUS DETECTION BASED ON ISOTHERMAL AMPLIFICATION RPA

М. А. Капитонова[1,2], А. В. Шабалина[1], В. Г. Дедков[1,3], А. С. Долгова[1]

[1] *Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера*
[2] *Санкт-Петербургский государственный университет*
[3] *Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского, Москва*

M. A. Kapitonova[1,2], A. V. Shabalina[1], V. G. Dedkov[1,3], A. S. Dolgova[1]

[1] *Saint Petersburg Pasteur Institute*
[2] *Saint Petersburg State University*
[3] *Martsinovsky Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Moscow*

✉ kapitonova.marin@gmail.com

Аннотация

В данной работе представлена разработка и тестирование двух способов обнаружения вируса *Mammarenavirus juninense* на основе изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA). Первый способ представляет собой совмещение RPA и метода детекции DETECTR на основе специфической нуклеазы Cas12a в одной пробирке. Второй способ детекции — RPA с обратной транскрипцией в реальном времени. Лимит детекции данного метода — менее 10 копий РНК фрагмента вируса.

Abstract

Here we present the development and testing of two methods for *Mammarenavirus juninense* virus detection based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). The first method is a combination in a single tube of RPA and the DETECTR based on a specific nuclease activity of Cas12a. The second method is a real-time RPA with reverse transcription. The detection limit of the second approach is less than 10 copies of RNA.

Mammarenavirus juninense (JUNV) — это РНК-содержащий вирус из семейства *Arenaviridae*, рода *Mammarenavirus*. Для человека JUNV является возбудителем Аргентинской геморрагической лихорадки (АГЛ). Естественным носителем данного вируса является грызун *Calomys musculinus*. Путь передачи вируса к человеку — непосредственный контакт или вдыхание аэрозолей от выделений инфицированных грызунов. Кроме того, зарегистрированы случаи передачи вируса от человека к человеку. Инкубационный период АГЛ составляет от 6 до 12 дней. Первыми появляются гриппоподобные симптомы, на вторую неделю заболевания возможно развитие тяжелых неврологических и геморрагических симптомов. Уровень смертности госпитализированных пациентов оценивается до 20 %. По подсчетам, около пяти миллионов людей находятся под риском заражения АГЛ [1]. Диагностика АГЛ производится на основе клинических и лабораторных анализов. Однако данные тесты могут занимать продолжительное время и требовать специального дорогостоящего оборудования, например амплификаторов реального времени, не всегда доступных в лабораториях стран Южной Америки. Поэтому остается актуальной задачей разработка дополнительных, в частности изотермических, методов быстрой диагностики АГЛ.

В данной работе представлены два метода обнаружения РНК вируса JUNV на основе изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA): 1) при помощи платформы DETECTR с использованием нуклеазы Cas12a, совмещенной с RPA в одной пробирке (DETECTR/RPA); 2) RPA с обратной транскрипцией в режиме реального времени с использованием специфических модифицированных зондов (RT-RPA exo). В качестве участка для детекции на основе биоинформатического анализа выбран консервативный участок гена L-сегмента длиной 158 нуклеотидов.

В основе диагностической платформы DETECTR лежит способность фермента Cas12a к коллатеральной нуклеазной активности [2]. Для амплификации использованы реактивы из набора TwistAmp® Liquid Basic

* Исследование выполнено при поддержке государственной программы «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации».

© М. А. Капитонова, А. В. Шабалина, В. Г. Дедков, А. С. Долгова, 2024

(TwistDx™, UK). Для проведений реакций амплификации и детекции в одной пробирке 14 мкл смеси для RPA (содержащей специфические праймеры к участку JUNV) наносятся внутрь пробирки и 10 мкл смеси DETECTR (с Cas12a, гРНК и зондом) — на крышку пробирки. В смесь для RPA добавляется 1 мкл образца нуклеиновых кислот, пробирка аккуратно закрывается и инкубируется 30 мин при +40 °C для прохождения амплификации. После этого капли с крышек сбрасываются, пробы перемешиваются и ставятся в прибор для регистрации флуоресцентного сигнала при +40 °C в течение 30 мин.

Для проведения анализа RT-RPA exo используется набор TwistAmp® exo kit (TwistDx™, UK). Подобран специфический флуоресцентный зонд с модификацией dSpacer CE фосфорамидит, в области которого происходит расщепление при комплементарной связывании с последовательностью мишени. Подобрана оптимальная концентрация обратной транскриптазы M-MulV 0,5 мкл 200 U/ml на 1 реакцию 50 мкл. Анализ осуществляется при +40 °C за 20 мин.

Для тестирования обоих методов собраны положительные рекомбинантные контрольные образцы, включающие диагностическую область-мишень и фланкирующие последовательности. Контрольный образец ДНК К+ представляет собой линейную молекулу 620 п. о., РНК К+ — его транскрибированный аналог, а ПКО К+ — оболочки MS2-фага с РНК, содержащей целевой фрагмент. Концентрации ДНК и РНК К+ измерены при помощи Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация РНК ПКО К+, выделенной набором «РИБО-преп» (АмплиСенс®, Россия), измерена методом ddPCR (BioRad, США). Все реакции и анализ флуоресцентного сигнала проведены на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

Разработанные методы оптимизированы для достижения наибольшей чувствительности детекции. Подобраны условия для прохождения каждой реакции: температура и время. Выбраны специфические праймеры для изотермической амплификации, гидовая РНК, флуоресцентны зонд для RPA exo и неспецифический зонд DETECTR. Лимит детекции метода DETECTR/RPA составляет менее 100 копий на реакцию для ДНК К+. RT-RPA exo показал лимит детекции менее 10 копий/мкл для РНК К+ и 50 копий/мкл ПКО К+. Таким образом, в данной работе представлены методы DETECTR/RPA и RT-RPA exo для достоверной диагностики вируса JUNV в изотермических условиях за 60 и 20 мин соответственно.

Литература

1. Gómez R. M., Jaquenod de G. C., Sanchez V. M. M. et al. Junín virus. A XXI century update // Microbes and Infection. 2011. Vol. 13 (4). P. 303–311.

2. Das A., Goswami H. N., Whyms C. T. et al. Structural principles of CRISPR-Cas enzymes used in nucleic acid detection // Journal of Structural Biology. 2022. Vol. 214. P. 107838.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-242

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В БОЛЬШОМ ВНЕКЛЕТОЧНОМ ДОМЕНЕ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NAPI2B *

IDENTIFICATION OF DISULFIDE BOND POSITIONS IN THE LARGEST EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE SODIUM–DEPENDENT PHOSPHATE TRANSPORTER NAPI2B

А. В. Килунов[1], Л. Ф. Булатова[1], Д. Д. Решетникова[1], В. С. Скрипова[1], Р. Г. Киямова[1], М. В. Богданов[2]

[1]НИЛ «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет
[2]Медицинская школа Макговерна, Научный центр здравоохранения Техасского университета, Хьюстон, США

A. V. Kilunov[1], L. F. Bulatova[1], D. D. Reshetnikova[1], V. S. Skripova[1], R. G. Kiyamova[1], M. V. Bogdanov[2]

[1]Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University
[2]McGovern Medical School, University of Texas Health Science Center, Houston, USA

✉ kilunov73@gmail.com

Аннотация

В рамках данной работы методом химической модификации малеимид-содержащими соединениями мутантных вариантов транспортера NaPi2b мы определили положения дисульфидных связей в большом внеклеточном домене, которые поддерживают его конформацию, необходимую для распознавания эпитопа MX35 моноклональными антителами.

Abstract

In this work, by chemical modification of mutant variants of the NaPi2b transporter with maleimide-containing compounds, we determined the positions of disulfide bonds in the largest extracellular domain, that maintain its conformation necessary for recognition of the MX35 epitope by monoclonal antibodies.

Введение. Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b является привлекательной мишенью для терапии онкологических заболеваний за счет своей мембранной локализации и повышенной экспрессии в ряде опухолей, включая рак яичника. В области большого внеклеточного домена (ВКД) транспортера NaPi2b находится потенциальный опухоль-специфический эпитоп MX35, который распознается терапевтическими антителами преимущественно в опухолевых клетках, но не в клетках нормальных тканей. Мы предполагаем, что в опухолевых клетках за счет дисульфидных связей между остатками цистеина C303, C322, C328 и C350 формируется особая конформация ВКД, при которой эпитоп MX35 доступен для распознавания антителами. Однако между какими остатками цистеина они образуются — неизвестно. Целью данной работы является определение положения дисульфидных связей в области ВКД транспортера NaPi2b в опухолевых клетках.

Материалы и методы. Интактные клетки линии рака яичника OVCAR-8 со стабильной экспрессией рекомбинантных мутантных вариантов транспортера NaPi2b с заменами двух из четырех остатков цистеина в области ВКД: C303A+C328A и C322+C328A обрабатывали реагентом mPEG-Mal-10кДа, ковалентно модифицирующим свободные сульфгидрильные группы остатков цистеина, в условиях с и без восстановления дисульфидных связей реагентом TCEP. Модификацию остатков цистеина mPEG-Mal-10кДа оценивали по изменению электрофоретической подвижности NaPi2b в клеточных лизатах методом вестерн-блот-анализа антителами против N-концевого домена транспортера NaPi2b.

Результаты. Во всех исследованных мутантных вариантах транспортера NaPi2b mPEG-Mal-10кДа модифицирует остатки цистеина в области ВКД транспортера NaPi2b только после восстановления дисульфидных связей с помощью TCEP. Это говорит о наличии дисульфидных связей в области ВКД C303-C350 и C322-C350 в мутантных вариантах транспортера NaPi2b C322A+C328A и C303A+C328A соответственно.

Заключение. Полученные результаты показывают, что остаток цистеина C350 способен образовать дисульфидную связь как с C303, так и с C322, что может иметь ключевое значение для формирования конформации ВКД транспортера NaPi2b, обеспечивающей доступность эпитопа MX35 для антител.

* Исследование выполнено за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (Приоритет-2030).

© А. В. Килунов, Л. Ф. Булатова, Д. Д. Решетникова, В. С. Скрипова, Р. Г. Киямова, М. В. Богданов, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-243

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО РНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДА С 5’-ТЕРМИНАЛЬНЫМ ФОСФАТОМ

PREPARATION AND APPLICATION OF SYNTHETIC RNA OLIGONUCLEOTIDE WITH 5’-TERMINAL PHOSPHATE

И. Б. Козлов, О. А. Герасимов, О. Ю. Домашева, Л. Г. Бушина, Д. М. Федосеева

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью ФМБА России, Москва

I. B. Kozlov, O. A. Gerasimov, O. Y. Domasheva, L. G. Bushina, D. M. Fedoseeva

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, FMBA of Russia, Moscow

✉ IKozlov@cspfmba.ru

Аннотация

Активно развиваются технологии создания генотерапевтических препаратов с использованием синтетических 5’-фосфорилированных РНК-олигонуклеотидов. Их синтез осложнен подбором методов постсинтетической очистки с использованием ВЭЖХ. Мы предлагаем способ комбинирования ВЭЖХ-методов для эффективной очистки целевого продукта. Структура полученных 5’-фосфорилированных РНК-олигонуклеотидов была подтверждены с помощью ВЭЖХ-МС-спектрометрии.

Abstract

Technologies for creating genotherapeutic drugs using synthetic 5’-phosphorylated RNA oligonucleotides are being actively developed. The synthesis of these oligonucleotides is complicated by the methods selection for post-synthetic purification using HPLC. We propose combination of HPLC methods for efficient purification of the target product. The structure of the obtained 5’-phosphorylated RNA oligonucleotides was confirmed by LC-MS.

В настоящее время активно развиваются технологии создания генотерапевтических препаратов с использованием синтетических олигонуклеотидов [1]. Ферментативная сборка длинных генетических конструкций осуществляется с использованием РНК-лигаз, для обеспечения активности которых необходимо наличие терминального фосфата на 5’-конце олигонуклеотида. Использование синтетических РНК в сборке генетических конструкций обладает преимуществом по сравнению с использованием линейных фрагментов нуклеиновых кислот, полученных в результате амплификации, поскольку дает возможность введения модифицированных нуклеотидов в конкретные участки последовательности. В то время как наличие терминального 5’-фосфата снижает зависимость от необходимости осуществления дополнительной стадии кинирования фрагментов и значительно сокращает длительность процесса. Такой подход позволяет обеспечить функциональную активность будущей фармацевтической субстанции.

Помимо получения линейных РНК, технология может быть использована для наработки синтетических кольцевых РНК с использованием Т4 РНК-лигазы 1, которая формирует интрамолекулярную связь между 5’-фосфатом и 3’-ОН группой.

Для формирования длинной последовательности РНК используются синтетические 5’-фосфорилированные РНК-олигонуклеотиды. Их производство осложнено подбором методов постсинтетической очистки с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии из-за низкой гидролитической стабильности самих молекул. Наиболее распространенным методом ВЭЖХ для очистки олигонуклеотидов является обращенно-фазовая хроматография. Однако удаление всех гидрофобных защитных групп в процессе присоединения фосфата на 5’-конец РНК-олигонуклеотида делает процесс очистки затруднительным.

В научной литературе описывается способ присоединения на 5’-конец синтетической РНК фотодеградирующего (PhotoCleavable, PC) линкера [2, 3]. Наличие в своей структуре гидрофобной диметокситритильной (DMT) защитной группы позволяет осуществлять очистку с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Последующее воздействие УФ-излучением (265 нм) на модифицированный PC-линкером РНК-олигонуклеотид приводит к полной деструкции линкерной молекулы с образованием терминального фосфата на 5’-конце РНК. Однако использование PC-линкера имеет ограничения, связанные со сложной логистикой из западных стран и относительно высокой стоимостью реагента.

© И. Б. Козлов, О. А. Герасимов, О. Ю. Домашева, Л. Г. Бушина, Д. М. Федосеева, 2024

В своей работе мы использовали комбинацию хроматографических методов, применение которой не зависит от гидрофобных свойств молекулы. Синтез РНК-олигонуклеотидов проводили амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе Polygen (Polygen GmbH, Германия). В качестве исходных реактивов использовали РНК-фосфорамидиты с TBDMS защитной группой на 2'-конце. В процессе синтеза РНК на финальной стадии присоединяли фосфорилирующий реагент II (CPR II). После снятия всех защитных групп с азотистых оснований, межнуклеотидных связей, 2'-положения рибозы и 5'-фосфатной группы РНК олигонуклеотид очищали с помощью ионно-обменной хроматографии. Пик на хроматограмме с наибольшей интенсивностью соответствовал искомому соединению и был собран полностью. Последующей гель-фильтрационной хроматографией синтезированную РНК отделяли от низкомолекулярных соединений. Полученные 5'-фосфорилированные РНК-олигонуклеотиды анализировали с помощью ВЭЖХ/МС-метода на соответствие расчетных масс.

Литература

1. Bege M., Borbás A. The medicinal chemistry of artificial nucleic acids and therapeutic oligonucleotides // Pharmaceuticals. 2022. Vol. 15, No. 8. P. 909.

2. Hu T. et al. Light-Triggered Signal Enhancement Strategy Integrated with a CRISPR/Cas13a-Based Assay for Ultrasensitive and Specific miRNA Detection // Analytical Chemistry. 2023. Vol. 95, No. 50. P. 18587–18594.

3. Wenzel T. et al. Genosnip: SNP genotyping by MALDI-TOF MS using photocleavable oligonucleotides // Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. 2003. Vol. 22, No. 5–8. P. 1579–1581.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-244

ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ НА ГЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ И ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВУЮ СИСТЕМУ САМЦОВ ЛИНИИ BTBR

INFLUENCE OF EARLY POSTNATAL INFLAMMATION ON GLIAL CELLS AND HYPOTHALAMIC-PITITUITARY-ADRENAL AXIS IN BTBR MALES

М. М. Колесникова[1,2], К. А. Айриянц[2],
Е. В. Межлумян[1,2], Н. П. Бондарь[2]

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

M. M. Kolesnikova[1,2], K. A. Ayriyants[2],
E. V. Mezhlumyan[1,2], N. P. Bondar[2]

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

✉ m.kolesnikova@g.nsu.ru

Аннотация

Мыши линии BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR) являются валидной моделью для изучения идиопатического аутизма. В данной работе рассмотрена способность опыта индуцированного раннего постнатального воспаления усиливать нейровоспаление и аберрантное функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, наблюдаемые как у пациентов с аутизмом, так и у мышей линии BTBR.

Abstract

BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR) mice are a valid model for studying idiopathic autism. This work examines the ability of the experience of induced early postnatal inflammation to enhance neuroinflammation and aberrant functioning of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis observed in both patients with autism and BTBR mice.

Многие психопатологии, в том числе расстройства аутистического спектра (РАС), сопровождаются нейровоспалением, что указывает на потенциальную вовлеченность иммунной системы в патофизиологию заболевания. В свою очередь, иммунные изменения могут влиять на активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) как на базальном уровне, так и в ответ на острый стресс. Однако до сих пор неизвестно, может ли воспаление, перенесенное в критические периоды развития головного мозга, усугублять наблюдаемые нарушения. Поэтому целью данной работы стало оценить влияние индуцированного воспаления в раннем возрасте на активацию астроглии и микроглии в гиппокампе, а также ГГНС самцов линии BTBR T+Itpr3tf/J (BTBR), которые демонстрируют поведенческие нарушения и иммунные особенности, аналогичные больным РАС.

Воспаление индуцировалось введением на 3-й и 5-й день жизни бактериального (Lipopolysaccharide (LPS), 50 мкг/кг) и вирусного (Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C), 10 мг/кг) миметиков или их комбинации. Контрольной группе был введен эквивалентный объем физиологического раствора. На 40-й день животные выводились из эксперимента и была оценена экспрессия генов Serpina3n (ингибитор сериновых протеаз, экспрессируемый астроцитами и ассоциированный с провоспалительным ответом), Trem2 (мембранный рецептор, экспрессируемый микроглией) и NR3C1 (глюкокортикоидный рецептор) в дорсальном и вентральном гиппокампе.

При оценке уровня экспрессии генов *Serpina3n* и *Trem2* были выявлены достоверные межлинейные различия. При этом в дорсальном и вентральном гиппокампе мышей линии BTBR наблюдался пониженный уровень экспрессии гена *Trem2* (дорсальный гиппокамп: $p < 0{,}001$; вентральный гиппокамп: $p < 0{,}001$) и, наоборот, повышенная экспрессия гена *Serpina3n* (дорсальный гиппокамп: $p < 0{,}001$; вентральный гиппокамп: $p < 0{,}001$) по сравнению с мышами линии C57BL/6J. Помимо этого в дорсальном гиппокампе мышей линии C57BL/6J уровень экспрессии гена *Trem2* был выше у групп с сочетанным введением миметиков ($p < 0{,}001$) и отдельным

© М. М. Колесникова, К. А. Айриянц, Е. В. Межлумян, Н. П. Бондарь, 2024

введением LPS (p = 0,04647) по сравнению с контрольной группой. В то же время экспрессия гена *Serpina3n* в дорсальном гиппокампе мышей линии BTBR была ниже у мышей, которым вводился LPS по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, мыши линии BTBR демонстрируют сниженную противовоспалительную активность микроглии и повышенную провоспалительную активность астроглии. Помимо этого, в дорсальном гиппокампе мышей линии BTBR не изменяется микроглиальная активность после опыта раннего постнатального стресса, в отличие от контрольной линии, где введение бактериального миметика и его сочетания с вирусным приводило к более выраженному микроглиальному ответу. При этом после введение миметика бактериального воспаления провоспалительная активность астроцитов в дорсальном гиппокампе мышей линии BTBR была менее выраженная, чем у контрольной группы.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-245

ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК-КАРДИОМИОЦИТОВ

APPROACHING MOLECULAR MECHANISMS INVOLVED IN DIFFERENTIATION OF IPSCS TO CARDIOMYOCYTES

Д. В. Кононова[1], С. Д. Робустова[1], А. А. Аитова[1], С. А. Щербина[1], М. М. Слотвицкий[1], В. А. Цвелая[1], А. И. Гусев[2], Е. И. Шагимарданова[2], К. И. Агладзе[1]

[1]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2]*Казанский федеральный университет*

D. V. Kononova[1], S. D. Robustova[1], A. A. Aitova[1], S. A. Shcherbina[1], M. M. Slotvitsky[1], V. A. Tsvelaya[1], A. I. Gusev[2], E. I. Shagimardanova[2], K. I. Agladze[1]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*Kazan Federal University*

✉ kononova.dv@phystech.edu

Аннотация

Данная работа является продолжением предыдущего исследования [1], в ходе которого было показано, что ИПСК-кардиомиоциты, рассаженные до 20-го дня дифференцировки, могут эффективно формировать функциональный синцитий, а клетки, рассаженные после 20-го дня, — нет. Чтобы выяснить, что вызывает изменение электрофизиологических показателей после 20-го дня, был проведен анализ на уровне транскриптома.

Abstract

In the previous study [1] was revealed that iPSC-derived cardiomyocytes seeded before day 20 of differentiation can effectively form a functional syncytium, while cells seeded after day 20 cannot. To find out what causes changes in electrophysiological parameters after day 20, we performed transcriptomic analysis.

По данным Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности во все мире [2]. Только в 2021 г. сердечно-сосудистые заболевания стали причиной смерти 20,5 млн человек, и эта цифра составила около трети всех смертей в мире. Для понимания патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, а также для разработки новых методов лечения необходимо создание реалистичных моделей заболеваний [3]. Большими перспективами в области как фундаментальной, так и трансляционной медицины обладает применение технологии использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Развивающаяся технология использования ИПСК-кардиомиоцитов может значительно облегчить изучение наследственных и приобретенных сердечно-сосудистых заболеваний, инфекционных заболеваний, исследование развития сердечно-сосудистой системы, разработку лекарств, токсикологический скрининг и персонализированную клеточную терапию [3]. Но существует проблема клеточного фенотипирования и созревания кардиомиоцитов в процессе дифференцировки из ИПСК, поэтому необходимо изучать сам процесс дифференцировки для получения взрослого пациент-специфичного фенотипа *in vitro*.

Нашей группой было проведено исследование формирования проводящего слоя клеток, полученных из ИПСК дифференцировкой в кардиомиоциты по Gi-Wi-протоколу [1]. В ходе работы было выявлено, что клетки, рассаженные до 20-го дня дифференцировки, могут эффективно формировать функциональный синцитий. Клетки, рассаженные после 20-го дня, не формируют функциональный слой. В связи с этим явлением была выдвинута гипотеза, предполагающая, что нарушается формирование щелевых контактов. Однако, так как флуоресцентное окрашивание на белок Cx43 не выявило изменений до и после 20-го дня, данное предположение было отвергнуто. Для того чтобы выяснить, что вызывает изменение электрофизиологических показателей после 20-го дня, решено было провести анализ на уровне транскриптома.

Образцы трех разных дней дифференцировки (0, 17 и 25) были заморожены и отправлены для анализа транскриптома. Там была выделена тотальная РНК, проведено обогащение библиотек по мРНК и секвенирование

© Д. В. Кононова, С. Д. Робустова, А. А. Аитова, С. А. Щербина, М. М. Слотвицкий, В. А. Цвелая, А. И. Гусев, Е. И. Шагимарданова, К. И. Агладзе, 2024

(Illumina NovaSeq). Мы получили парноконцевые чтения для каждого образца и для них провели анализ дифференциальной экспрессии (salmon, DESeq) для пар 0–17, 0–25 и 17–25. Сравнениями 0–17 и 0–25 подтвердили, что образцы 17-го и 25-го дня являются кардиомиоцитами, и получили списки дифференциально экспрессируемых генов. Из списков видно, что повышается экспрессия (от 17-го к 25-му дню) ряда белков сократительного аппарата (MYH7, TNNC1) и белков EMC (SPOCK2, MGP, ITLN1).

Литература

1. Slotvitsky M. M. et al. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes // Scientific Reports 2020. Vol. 10, No. 1. P. 7774.

2. Murray C. J. L. The Global Burden of Disease Study at 30 years // Nature Medicine 2022. Vol. 28, No. 10. P. 2019–2026.

3. Morita Y. et al. Scalable manufacturing of clinical-grade differentiated cardiomyocytes derived from human-induced pluripotent stem cells for regenerative therapy // Cell Proliferation. 2022. Vol. 55, No. 8. P. e13248.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-246

ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДАННЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГОВ ГРУППЫ *BACILLUS CEREUS SENSU LATO* *

THE USE OF BIOINFORMATICS METHODS FOR BUILDING A DATABASE OF BACTERIOPHAGE ENDOLYSINS OF THE *BACILLUS CEREUS SENSU LATO* GROUP

О. Н. Копосова, О. А. Казанцева, А. М. Шадрин

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Пущино

O. N. Koposova, O. A. Kazantseva, A. M. Shadrin

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino

✉ olga.n.koposova@mail.ru

Аннотация

Модификации доменов эндолизинов позволяют получить ферменты с требуемыми свойствами, но для этого необходимо подробное изучение этих доменов. Эндолизины бактериофагов группы *Bacillus cereus sensu lato* разнообразны по доменному составу и могут выступать в качестве удобной модели для их исследования. Была создана база данных эндолизинов бациллярных бактериофагов и проанализирован их доменный состав.

Abstract

The modifications of endolysin domains make it possible to obtain enzymes with the required properties, but this requires a detailed study of these domains. Endolysins of the bacteriophages of the *Bacillus cereus sensu lato* group are diverse in terms of domain composition and can serve as a convenient template for their study. A database of endolysins of bacillus bacteriophages was created and their domain composition was analyzed.

Эндолизины — литические ферменты бактериофагов, закодированные в их геноме и синтезирующиеся на финальной стадии жизненного цикла бактериофага. Они расщепляют пептидогликановый слой бактерии, зараженной бактериофагом, что приводит к ее разрушению, а потомство бактериофага выходит наружу. Из-за этого эндолизины рассматривают в качестве новых антибиотиков, что особенно важно в эпоху ускоренного распространения антибиотикорезистентности. Отдельное внимание уделяют модифицированным эндолизинам, измененным с целью получить более эффективные молекулы. Так как эндолизины имеют доменную структуру, нередко вносимые изменения связаны с комбинированием различных доменов [1].

Эндолизины бактериофагов против *Bacillus cereus sensu lato* отличаются разнообразием своего доменного состава [2]. Эта их особенность позволяет на их примере исследовать различные домены, их сочетания и модификации.

Немаловажно и то, что в группу *Bacillus cereus sensu lato* входят такие патогены, как *B. cereus* и *B. anthracis* [3]. Для лечения вызываемых ими инфекций сейчас применяют антибиотики. Эндолизины также могут быть использованы с этой целью.

Поэтому мы создали базу данных эндолизинов бациллярных бактериофагов и проанализировали доменный состав вошедших в нее ферментов. На первом этапе из базы данных NCBI Nucleotide database было получено 440 нуклеотидных последовательностей геномов бациллярных бактериофагов (на 04.09.2023). Второй этап — реаннотация в RASTk всех этих геномов с последующим отбором генов, потенциально кодирующих эндолизины. На третьем этапе аминокислотные последовательности выбранных ферментов загружались в BLASTp (база данных non-redundant protein sequences (nr) для организмов Viruses (taxid:10239), алгоритм PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST)) и HHpred (базы данных доменов Pfam-A_v36, COG_KOG_v1.0, SCOPe70_2.08, NCBI_conserved_Domain(CD)_v3.19 и параметры по умолчанию). По результатам работы обеих программ были отобраны потенциальные эндолизины, всего 459 последовательностей. На четвертом этапе был определен доменный состав этих эндолизинов при помощи BLASTp, HHpred и InterPro. Всего было выявлено 15 типов доменов, 8 из которых каталитические домены и 7 — домены связывания с клеточной стенкой (см. таблицу).

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-15-00385).

© О. Н. Копосова, О. А. Казанцева, А. М. Шадрин, 2024

Домены эндолизинов бактериофагов группы *Bacillus cereus sensu lato*

Тип домена	Номер в InterPro	Количество доменов
Amidase_2	PF01510	193
Amidase_3	PF01520	83
Peptidase M15	PF08291	58
NLPC/P60	PF00877	3
MLTF-like	cd13403	1
GHF-25	PF01183	75
GHF-24	IPR051018	26
GHF-73	IPR051056	16
SH3	PF00018	143
LysM	PF01476	80
CBD_PlyG	PF12123	69
PG_binding_1	PF01471	48
DUF3597	PF12200	35
DUF5776	PF19087	6
SPOR	PF05036	5

Для 76 последовательностей домены связывания с клеточной стенкой идентифицированы не были. Все ферменты были разделены на 8 групп по типам каталитических доменов и для групп с более чем тремя последовательностями были построены филогенетические древа в MEGA X. Эти деревья позволяют выбрать эндолизины для дальнейших исследований из разных групп по каталитическим доменам и с различными доменами связывания с клеточной стенкой.

Литература

1. Murray E., Draper L.A., Ross R.P., Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting // Viruses. 2021. Vol. 13. P. 680.

2. Criel B., Taelman S., Van Criekinge W. et al. PhaLP: A Database for the Study of Phage Lytic Proteins and Their Evolution // Viruses. 2021. Vol. 13. P. 1240.

3. Okinaka R.T., Keim P. The Phylogeny of Bacillus cereus sensu lato // Microbiol. Spectr. 2016. Vol. 4. P. 4.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-247

РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК В СОСТАВЕ МОДЕЛЬНЫХ R-ПЕТЕЛЬ РИБОНУКЛЕАЗОЙ H1 *E. COLI* *

CLEAVAGE OF RNA WITHIN MODEL R-LOOPS BY RIBONUCLEASE H1 *E. COLI*

Ю. А. Косарев[1,2], Н. А. Тимофеева[2], А. А. Кузнецова[2], Н. А. Кузнецов[1,2]

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

I. A. Kosarev[1,2], N. A. Timofeeva[2], A. A. Kuznetsova[2], N. A. Kuznetsov[1,2]

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

✉ iuriikosarev@yandex.ru

Аннотация

В данной работе проведен кинетический анализ особенностей взаимодействия РНКазы H1 из *E. coli* с модельными R-петлями различной структуры в стационарных условиях. Показано, что на скорость гидролиза РНК-праймера в составе модельных R-петель под действием РНКазы H1 оказывает значительный эффект размер гетеродуплексной части R-петли. Также исследован гидролиз РНК-праймера в составе модельных R-петель под действием РНКазы H1 в присутствии РНК-полимеразы. Показано, что в присутствии РНК-полимеразы гидролиз РНК-праймера в составе модельных R-петель под действием РНКазы H1 протекает медленнее.

Abstract

In this study, the kinetic analysis of the interaction of RNase H1 from *E. coli* with model R-loops of different structures under steady-state conditions was performed. It has been shown that the rate of hydrolysis of the RNA-primer in the model R-loops under the action of RNase H1 is significantly affected by the size of the heteroduplex moiety. The hydrolysis of the RNA-primer in the model R-loops under the action of RNase H1 in the presence of RNA polymerase was also studied. It was shown that in the presence of RNA polymerase, the hydrolysis of the RNA primer in the model R-loops under the action of RNase H1 proceeds more slowly.

Одновременное протекание процессов репликации и транскрипции на близлежащих участках молекулы ДНК приводит к взаимному влиянию и нарушению обоих процессов. Репликативные вилки, приближающиеся к генам с высокой степенью транскрипции, индуцируют образование R-петлей и способствуют развитию конфликта транскрипции-репликации (Transcription-Replication Conflict, TRC). При этом последствия TRC различаются в зависимости от того, в какую сторону движутся транскрипционный и репликативный комплексы. Так, например, у бактерий большинство генов организованы сонаправленно, что позволяет избегать встречный конфликт, однако некоторые ключевые гены вирулентности и реакции на стресс ориентированы во встречном направлении относительно репликации. Установлено, что встречный конфликт приводит к остановке процесса репликации и является основным источником нестабильности генома, как непосредственно за счет блокирования репликации, так и за счет повышения риска повреждения одноцепочечного участка ДНК в R-петлях.

Идентификация клеточных регуляторных механизмов, ответственных за деблокирование репликации в процессе TRC и изучение молекулярных механизмов, которые используются клетками для предотвращения негативных эффектов R-петель, имеет важное значение для понимания основных клеточных функций поддержания стабильности геномной ДНК. Один из механизмов разрешения TRC в геномной ДНК осуществляется с помощью членов семейства ферментов, обладающих активностью РНКазы H.

В связи с этим в рамках настоящей работы с целью реконструкции *in vitro* молекулярных взаимодействий между белками — участниками процесса TRC проведен кинетический анализ особенностей взаимодействия РНКазы H1 из *E. coli* с модельными R-петлями различной структуры в стационарных условиях. Показано, что на скорость гидролиза РНК-праймера в составе модельных R-петель под действием РНКазы H1 оказывает значительный эффект размер гетеродуплексной части R-петли. Также исследован гидролиз РНК-праймера в составе модельных R-петель под действием РНКазы H1 в присутствии РНК-полимеразы. Показано, что в присутствии РНК-полимеразы гидролиз РНК-праймера в составе модельных R-петель под действием РНКазы H1 протекает медленнее.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-44-00064).

© Ю. А. Косарев, Н. А. Тимофеева, А. А. Кузнецова, Н. А. Кузнецов, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-248

ГОНОКОККОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОСТРОВ — МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДРАЙВЕР РАСПРОСТРАНЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ *NEISSERIA GONORRHOEAE* *

GONOCOCCAL GENETIC ISLAND AS A MOLECULAR DRIVER OF THE SPREAD OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *NEISSERIA GONORRHOEAE*

Д. В. Кравцов

Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

D. V. Kravtsov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow

✉ solo13.37@yandex.ru

Аннотация

Распространение антибиотикорезистентных штаммов *N. gonorrhoeae* является глобальной проблемой здравоохранения. В настоящей работе была установлена связь гонококкового генетического острова (GGI) с устойчивостью к антимикробным препаратам, изучено его генетическое разнообразие в мировой популяции, а также выявлена связь между GGI и сиквенс-типами из широко применяемых схем генотипирования.

Abstract

The spread of antibiotic-resistant strains of *N. gonorrhoeae* is a global public health problem. The present study revealed the association of the gonococcal genetic island (GGI) with antimicrobial resistance, studied its genetic diversity in the world population, and identified the relationship between GGI and sequence types from widely used genotyping schemes.

Гонорея, вызываемая грамотрицательной бактерией *N. gonorrhoeae*, — одна из наиболее распространенных в мире инфекций, передаваемых половым путем. История применения антибиотиков для лечения *N. gonorrhoeae* свидетельствует о стремительном распространении устойчивости к ним, в том числе благодаря механизмам горизонтального переноса генов. Одним из таких механизмов у *N. gonorrhoeae* является система секреции IV типа (T4SS), кодируемая генами гонококкового генетического острова (GGI). Она позволяет *N. gonorrhoeae* выбрасывать во внеклеточную среду ДНК, которая затем специфично распознается пилями клетки-реципиента и рекомбинируется в ее геном (рис. 1).

Был проведен анализ GGI в глобальной выборке в 14 763 геномов изолятов, собранных в 1996–2019 гг. в 68 странах, включая 48 отсеквенированных в этой работе геномов из России (GenBank PRJNA768989). Задачами работы являлось изучение генетического разнообразия GGI, выявление ассоциации между GGI и молекулярными типами из традиционных схем молекулярного типирования *N. gonorrhoeae* NG-MAST и MLST, а также установление связи GGI с устойчивостью к антибиотикам.

В ходе анализа выяснилось, что только 66 % изолятов имеют GGI, при этом 22 % из них имеют изменения и поломки в генах GGI, приводящие к потере функциональности T4SS, т. е. способности секретировать ДНК. Была предложена модель генетического разнообразия GGI, предполагающая разделение GGI мировой гонококковой популяции на 51 кластер и 3 суперкластера (рис. 2). Это разделение отражает различия в функциональности GGI у разных изолятов. Системы типирования NG-MAST и MLST с точностью 91 и 83 % соответственно позволяют сделать вывод о наличии GGI и кластера GGI, а значит, о структуре гонококкового острова и о способности изолята секретировать ДНК в среду. Распределение суперкластеров GGI глобально не связано с филогенетикой NG-MAST и MLST, что указывает на многократный горизонтальный перенос GGI, поскольку он сам является мобильным элементом.

Почти все российские изоляты обладали дефектами в критически важных генах, кодирующих белки AtlA и TraG (см. рис. 1), приводящими к потере функциональности GGI, и входили в суперкластер B. Кроме того, эти изоляты были чувствительны к большинству антибиотиков, что согласуется с выявленной в этой работе взаимосвязью между функциональностью GGI и устойчивостью к антимикробным препаратам.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2019-1660).

© Д. В. Кравцов, 2024

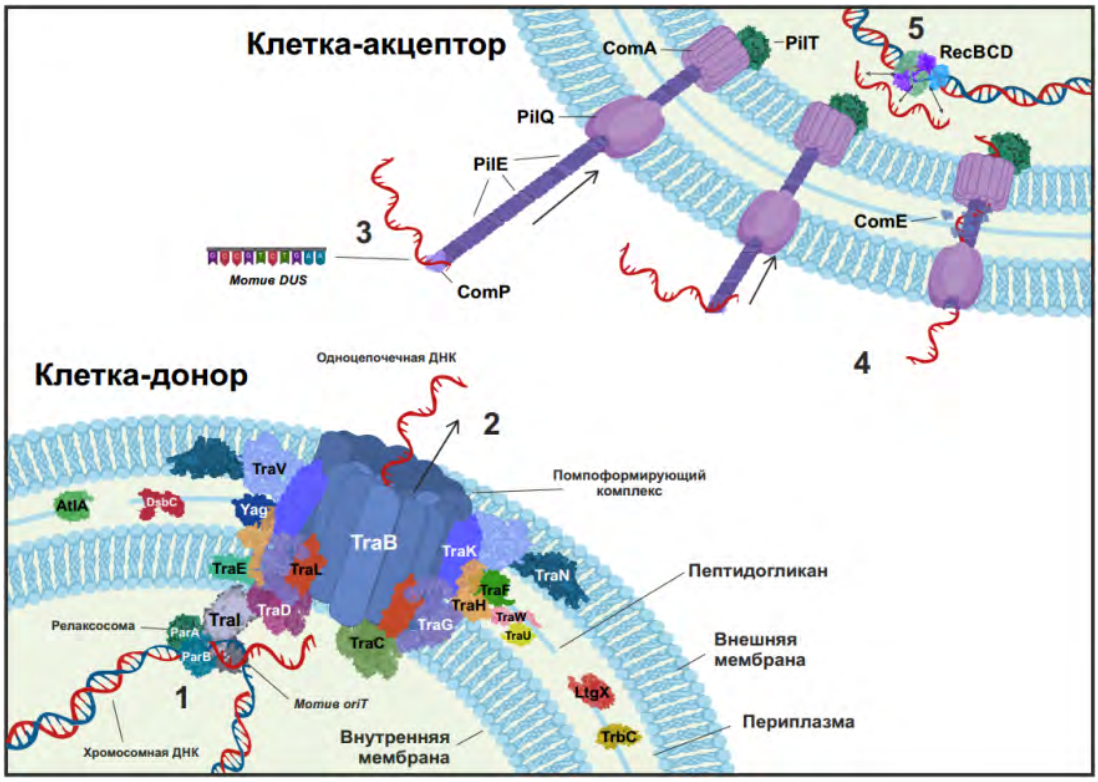


Рис. 1. Механизм работы системы секреции IV типа, кодируемой GGI. Отражены основные компоненты T4SS, системы компетентности и пилей IV типа. Показаны этапы горизонтального транспорта генов с помощью этой системы: *1* — разрезание одной из цепей хромосомы клетки-донора; *2* — одноцепочечная ДНК выходит через помпу T4SS за пределы клетки; *3* — одноцепочечная ДНК связывается с пилями клетки-акцептора; *4* — происходит втягивание пили, в результате чего ДНК переносится в периплазму клетки-акцептора; *5* — ДНК встраивается в геном клетки-акцептора

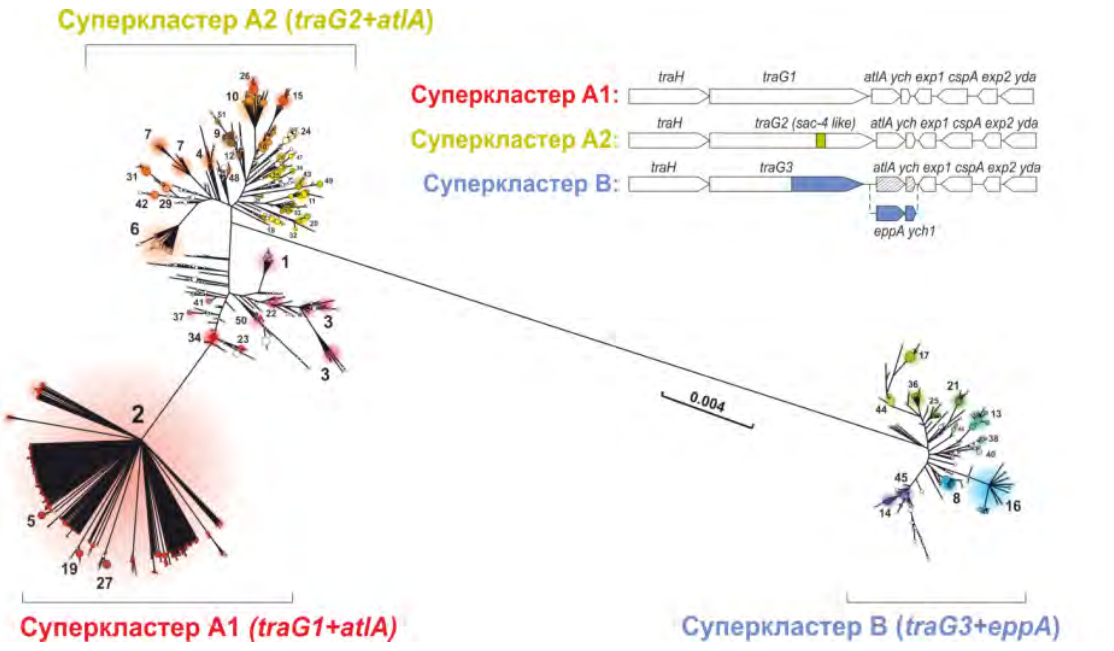


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное для генов GGI из 9776 геномов. Показаны три суперкластера (A1, A2 и B) и пятьдесят один кластер. Кластеры выделены разными цветами. Справа вверху показаны характерные различия в генах GGI (в основном в генах *traG*, *atlA/eppA* и *ych/ych1*) между суперкластерами

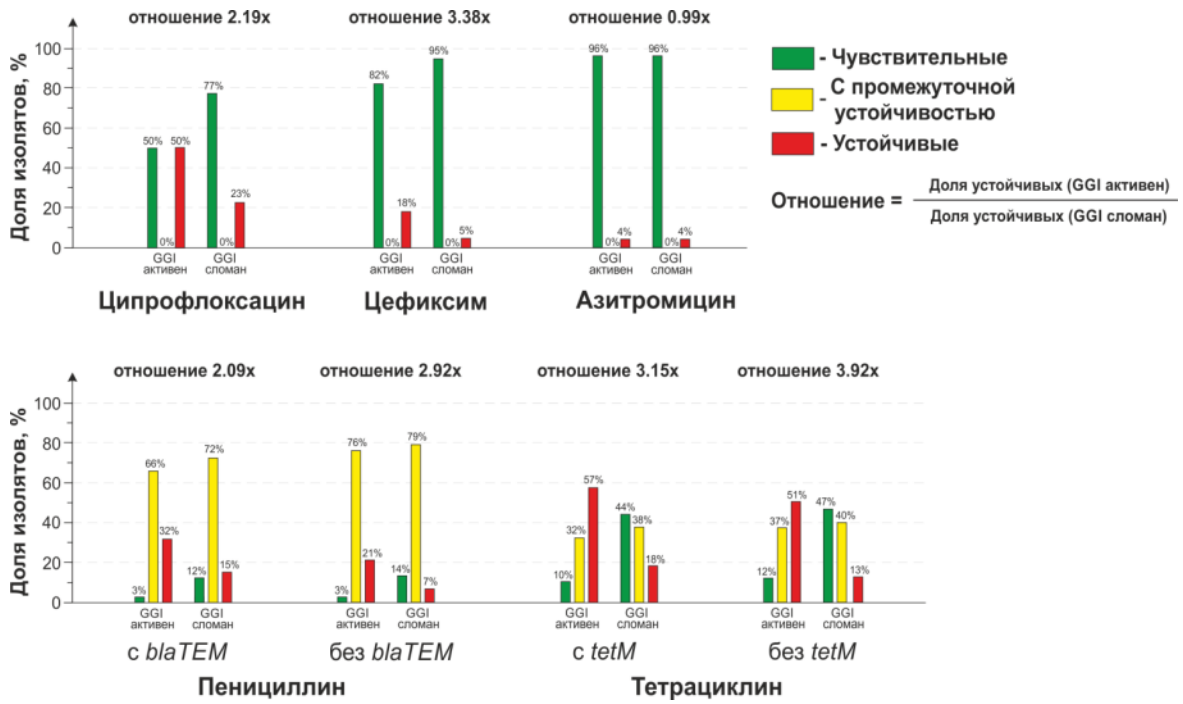


Рис. 3. Распределение изолятов по чувствительности к антимикробным препаратам в зависимости от наличия функционального GGI или нефункционального GGI в геноме. Показано отношение доли устойчивых изолятов с функциональным (активным) GGI к доле устойчивых изолятов с нефункциональным (с поломками) GGI. Для пенициллина и тетрациклина отражено распределение изолятов с учетом тех, кто имел плазмид *blaTEM/tetM*, и без их учета

Было проведено попарное сравнение распределения устойчивости к антимикробным препаратам у изолятов *N. gonorrhoeae* с функциональным и нефункциональным GGI (рис. 3). Была обнаружена статистически значимая связь ($p < 0{,}001$) между наличием функционального GGI и долей изолятов, устойчивых к применявшимся ранее и применяемым сейчас препаратам для терапии: ципрофлоксацину, цефиксиму, тетрациклину и пенициллину. Это наблюдение свидетельствует о важности определения не только наличия GGI, но и его функциональности для прогнозирования распространения устойчивости к антимикробным препаратам в популяции.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-249

БЕЛОК NS1 ВИРУСА ОМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ *

OMSK HEMORRHAGIC FEVER VIRUS NS1 PROTEIN: ROLE IN PATHOGENESIS

Б. И. Кравчук [1], Я. А. Хлусевич [1], Г. С. Чичерина [2], Н. В. Тикунова [1], А. А. Кечин [1], А. Л. Матвеев [1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск*

B. I. Kravchuk [1], Ya. A. Khlusevich [1], G. S. Chicherina [2], N. V. Tikunova [1], A. A. Kechin [1], A. L. Matveev [1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Institute of Systematics and Ecology of Animals SB RAS, Novosibirsk*

✉ bogdakravchuk@gmail.com

Аннотация

Роль белка NS1 флавивирусов, переносимых клещами, в патогенезе заболеваний мало изучена. Кроме того, отсутствуют данные о кросс-реактивности антител против белков NS1 различных вирусов из группы вируса клещевого энцефалита. Эти данные имеют особый интерес для мониторинга вирусных энцефалитов с неизвестной этиологией и изучения патогенеза пренебрегаемых флавивирусных инфекций, переносимых клещами.

Abstract

The role of the NS1 protein of tick-borne flaviviruses in disease pathogenesis is poorly investigated. In addition, there are no data on cross-reactivity of antibodies against NS1 proteins of different viruses from the tick-borne encephalitis virus group. These data are of particular interest for the monitoring of viral encephalitis with unknown etiology and studying the pathogenesis of the of neglected flavivirus infections carried by ticks.

Омская геморрагическая лихорадка (ОГЛ) — зоонозное инфекционное заболевание, которое вызывается вирусом омской геморрагической лихорадки (ВОГЛ, *Orthoflavivirus omskense*), содержащим одноцепочечный (+) РНК-геном. В течение инкубационного периода у инфицированных людей развиваются неспецифические гриппоподобные симптомы, за которыми следует появление первичных специфических симптомов. Диагностика этой инфекции является симптоматической, и в случае отсутствия геморрагических проявлений данная патология остается не диагностируемой.

Для диагностики ВОГЛ, как и для других флавивирусов, использование молекулярно-генетических методов ограничено из-за особенностей жизненного цикла этих вирусов в организме человека. В связи с этим диагностика ОГЛ основана на клинических признаках, а наличие кросс-реактивности между антителами против белка Е вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) и ВОГЛ исключает использование существующих серологических наборов для дифференциальной диагностики этих заболеваний. В настоящее время показано, что наиболее подходящим агентом для дифференциальной серологической диагностики флавивирусов является неструктурный белок NS1 — высококонсервативный белок, присутствующий в организме во время инфекции в разных формах. Он является одним из ключевых элементов патогенеза флавивирусов, переносимых комарами, вызывающих лихорадку денге и лихорадку Западного Нила. Однако роль этого белка в патогенезе флавивирусов, переносимых клещами, не до конца изучена.

В связи с этим целью данного исследования было получение рекомбинантного белка NS1 ВОГЛ, изучение его антигенных свойств и его влияния на проницаемость клеток эндотелия человека.

В результате работы были получены плазмиды, обеспечивающие экспрессию белка NS1 ВОГЛ, и препараты очищенного белка NS1 ВОГЛ. Методами вестерн-блот-анализа и ИФА с использованием полученного белка NS1 ВОГЛ было показано, что моноклональные антитела против NS1 ВКЭ выявляли белок NS1 ВКЭ, но не выявляли белок NS1 ВОГЛ. Иммунная сыворотка, полученная от инфицированных ВОГЛ мышей, выявляла полученный белок. Поскольку моноклональные антитела не выявили NS1 ВОГЛ, нами были исследованы сыворотки, полученные от больных КЭ, на наличие антител к NS1 ВОГЛ. Специфичность ИФА с использованием рекомбинантного белка NS1 ВОГЛ для дифференциальной диагностики КЭ и ОГЛ составила не менее 90 %.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-74-10103).

© Б. И. Кравчук, Я. А. Хлусевич, Г. С. Чичерина, Н. В. Тикунова, А. А. Кечин, А. Л. Матвеев, 2024

Для изучения влияния на проницаемость эндотелия капилляров легкого (HLMVEC) и клеток капилляров пуповины (HUVEC) использовали анализ трансэндотелиального электрического сопротивления (TEER), в результате которого было показано уменьшение сопротивления клеточного монослоя, обработанного белком NS1 ВОГЛ. Полученные результаты были подтверждены с использованием Transwell permeability теста.

Для поиска вероятных механизмов влияния белка NS1 ВОГЛ на проницаемость эндотелия и определения роли этого белка в патогенезе было проведено секвенирование транскриптома клеток HLMVEC после инкубации с этим белком. Полученные данные РНК-секвенирования были обработаны стандартными биоинформатическими инструментами. Данные указывают на активацию путей, ответственных за клеточную адгезию и кальций-зависимое соединение клеток в тканях организма.

Таким образом, в данной работе впервые был получен рекомбинантный белок NS1 ВОГЛ, который сохраняет антигенные свойства, сходные с нативным белком NS1 ВОГЛ. Впервые показано, отсутствие кросс-реактивности у моноклональных антител против NS1 ВКЭ к белку NS1 ВОГЛ. Показано, что в сыворотках пациентов с КЭ, содержащих антитела к белку NS1 ВКЭ, не были обнаружены кросс-реактивные антитела к белку NS1 ВОГЛ. Также было показано, что белок NS1 ВОГЛ увеличивает проницаемость двух разных линий клеток эндотелия человека. С помощью RNA-seq был предсказан вероятный механизм участия белка NS1 ВОГЛ в патогенезе.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-250

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ МРНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА

EFFECT OF VARIOUS MODIFIED NUCLEOTIDES ON IMMUNOGENICITY OF INFLUENZA MRNA VACCINE

С. И. Красникова, С. В. Шарабрин, Л. А. Кисакова, Л. И. Карпенко

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

S. I. Krasnikova, S. V. Sharabrin, L. A. Kisakova, L. I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo

✉ sveta.krasnikova2000@yandex.ru

Аннотация

мРНК-вакцины показали большие перспективы для создания потенциальных вакцин против вирусных инфекций. В данной работе определили влияние модифицированных нуклеотидов на иммуногенность мРНК, кодирующей антиген вируса гриппа H1N1. Изучение модифицированных нуклеотидов в мРНК позволило успешно освоить технологию мРНК-вакцин, так как они влияют на стабильность молекулы, трансляцию, активацию иммунной системы, что способствует созданию эффективных вакцин.

Abstract

mRNA vaccines have shown great promise for the development of potential vaccines against viral infections. In this work, we determined the effect of modified nucleotides on the immunogenicity of mRNA encoding the H1N1 influenza virus antigen. The study of modified nucleotides in mRNA has made it possible to successfully master the technology of mRNA vaccines, as they affect the stability of the molecule, translation, and activation of the immune system, which contributes to the creation of effective vaccines.

Способность модифицированных оснований изменять свойства мРНК нашла свое применение для создания вакцин на их основе, в первую очередь за счет того, что модифицированные мРНК нарушают взаимодействие с клеточными рецепторами, которые отвечают за активацию врожденного иммунного ответа, что, в свою очередь, повышает стабильность и период полураспада мРНК *in vivo*. Вместе с этим усиливается эффективность внутриклеточной трансляции с мРНК. 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 (A)-хвост на 3' конце. В качестве модифицированных оснований были использованы наиболее распространенные модификации: mΨ (N1-метил-псевдоуридин), Ψ (псевдоуридин), m5C (5-метилцитозин) и m6A (N6-метиладенозин). Эти модификации демонстрируют способность улучшать трансляционную активность мРНК, что делает их привлекательными кандидатами для использования в синтезе мРНК с высокой эффективностью. Но вопрос о влиянии модифицированных нуклеотидов на функцию синтетической РНК до сих пор остается открытым, поэтому для дальнейшего развития мРНК-вакцин необходимо всестороннее понимание того, как модификации влияют на РНК.

Цель исследования — оценить влияние модифицированных нуклеотидов, на иммуногенные свойства экспериментальных мРНК-вакцин против вируса гриппа A/California/4/2009/ (H1N1 pdm09).

Синтез мРНК, кодирующий белок гемагглютинина вируса гриппа H1N1, проводился с соответствующей матрицы — плазмидной ДНК, несущей ген H1 под контролем промотора фага T7, со встроенным поли(A)-хвостом длиной 100A. Для получения мРНК использовался набор для синтеза мРНК (БиолабМикс, Новосибирск) согласно протоколу производителя. Проводилось контранскрипционное кэпирование с использованием AG-cap аналога.

Таким образом, было получено 7 вариантов мРНК со следующим нуклеотидным составом: 1) A, G, C, U; 2) A, G, U, mC; 3) A, G, C, mΨ; 4) A, G, C, Ψ, m5C; 5) U, G, C, m6A; 6) G, Ψ, mA, mC; 7) A, G, C, Ψ.

Чтобы оценить эффективность экспериментальных вакцин мРНК против вируса гриппа, проводили двухкратную иммунизацию мышей линии BALB/c с интервалом в 2 недели с последующим анализом гуморального и клеточного ответа.

© С. И. Красникова, С. В. Шарабрин, Л. А. Кисакова, Л. И. Карпенко, 2024

В результате работы было показано, что иммунизация мРНК-вакцинами мышей линии BALB/c индуцирует синтез специфических антител, обладающих вируснейтрализующей активностью против вируса гриппа A/Calofornia/7/2009(H1N1)pdm09. Наилучший результат установлен с псевдоуридином и N1-метил-псевдоуридином, где средний титр антител составил 1 : 291600 и 1 : 133650.

Наилучший результат Т-клеточного ответа зарегистрировали с N1-метил-псевдоуридином, что составило 1030 на 1 млн клеток, секретирующих IFN-γ, а также с псевдоуридином, где среднее значение уже составило 938 на 1 млн клеток.

Наличие модифицированных нуклеотидов в мРНК, таких как m6A, могло привести к ускоренной деградации молекулы, а использование одновременно Ψ/m5C могло привести к подавлению процесса трансляции, поэтому в данных группах наблюдается отсутствие какого-либо специфического действия.

Полученные данные свидетельствуют о том, что включение N1-метил-псевдоуридина и псевдоуридина в составе мРНК-вакцин может способствовать созданию более эффективных вакцин против вируса гриппа. Улучшение обоих типов иммунного ответа предполагает, что эти модификации могут помочь создать более сбалансированный и устойчивый иммунитет, что является критически важным для защиты от вируса гриппа.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-251

ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРИЯ ПРИ НАРУШЕНИИ ВАКУОЛЯРНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ АТФАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ РОДА *OGATAEA* СВЯЗАНА С ВХОДОМ КАТИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЬ ИЗ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ *

HYPERSENSITIVITY TO SODIUM DODECYL SULFATE IN *OGATAEA* YEASTS WITH INACTIVATED VACUOLAR CALCIUM ATPASE IS EXERTED BY CALCIUM INFLUX INTO THE CYTOSOL FROM ENVIRONMENT

М. В. Кулакова, М. Д. Пахомова, В. А. Бидюк, М. О. Агафонов

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

M. V. Kulakova, M. D. Pakhomova, V. A. Bidiuk, M. O. Agaphonov

Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow

✉ kulakova_masha95@mail.ru

Аннотация

В данной работе мы показали, что SDS провоцирует Cch1-независимый вход Ca^{2+} из окружающей среды, а гиперчувствительность к SDS при нарушении Pmc1 является результатом неспособности противостоять повышению концентрации кальция в цитозоле, тогда как инактивация Cch1 частично восстанавливает эту способность. Это подразумевает наличие дополнительной функции Cch1, кроме транспорта Ca^{2+} в клетку.

Abstract

Here we show that SDS provokes Cch1-independent Ca^{2+} influx into cytosol from the environment. The SDS hypersensitivity in mutants with inactivated Pmc1 results from inability to cope with the cytosolic calcium concentration increase, while Cch1 inactivation partially rescues this trait. This implies the presence of an additional Cch1 Ca^{2+} function beyond cellular Ca^{2+} transport.

У дрожжей, как и у других эукариот, катионы кальция играют роль вторичного мессенджера, позволяющего клеткам реагировать на различные внешние стимулы. Клетке необходимо поддерживать концентрацию Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_{цит}$) на низком уровне. Это осуществляется за счет перекачивания Ca^{2+} из цитозоля во внутриклеточные депо. Основным депо Ca^{2+} в дрожжах является вакуоль, куда кальций откачивается из цитоплазмы за счет функционирования специальных переносчиков, включая АТФазу Pmc1, а из внешней среды он попадает в клетку через плазматическую мембрану с помощью белков Cch1 и Mid1[1].

У дрожжей рода *Ogataea* инактивация АТФазы Pmc1 вызывает гиперчувствительность к додецилсульфату натрия (SDS), которая не сопровождается дефектами клеточной стенки. Было показано, что такой фенотип супрессируется нарушением гена *CCH1* [2]. Это позволяло предполагать, что гиперчувствительность к SDS при нарушении Pmc1 связана с повышением $[Ca^{2+}]_{цит}$, а инактивация Cch1 снижает ее. Однако прямого подтверждения того, что нарушения генов *PMC1* и *CCH1* влияют на концентрацию кальция в цитозоле, получено не было. Для наблюдения за изменением $[Ca^{2+}]_{цит}$ был выбран генетически кодируемый индикатор Ca^{2+} GEM-GECO. Максимум эмиссии свободной от кальция формы индикатора находится на 513 нм, а кальций-связанной формы — около 450 нм.

Ранее нами было показано, что продукция индикатора GEM-GECO в некоторых случаях влияла на рост клеток дрожжей *O. parapolymorpha*, но при этом она не вызывала их гибели [3]. Это позволило нам применять его для отслеживания изменений $[Ca^{2+}]_{цит}$. Для измерения флуоресценции GEM-GECO в индивидуальных клетках был использован метод проточной цитометрии. В качестве характеристики $[Ca^{2+}]_{цит}$ использовали соотношение значений интенсивностей флуоресценции при длине волны 450 и 525 нм (FL_{450}/FL_{525}).

Добавление минимальной ингибирующей концентрации (МИК) SDS в культуральную среду вызывало резкий скачок $[Ca^{2+}]_{цит}$ в клетках дикого типа, после которого уровень цитозольного кальция постепенно снижался. Мы предположили, что SDS в более низких концентрациях тоже будет влиять на гомеостаз Ca^{2+}. Действительно, SDS вызывал значительное увеличение $[Ca^{2+}]_{цит}$ даже в концентрации в пять раз ниже МИК. При этом снижение концентрации SDS принципиально не меняло динамику изменения $[Ca^{2+}]_{цит}$, однако снижалась амплитуда ответа.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проекты № 24-14-00090 и 21-74-10115).

© М. В. Кулакова, М. Д. Пахомова, В. А. Бидюк, М. О. Агафонов, 2024

Рост $[Ca^{2+}]_{цит}$ был обусловлен притоком Ca^{2+} из внешней среды, поскольку присутствие хелатирующих агентов нивелировало этот эффект. В клетках с нарушением Pmc1, в отличие от клеток дикого типа, $[Ca^{2+}]_{цит}$ не снижалась, а продолжала расти. Примечательно, что динамика колебаний $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на SDS зависела от того, анализировалась ли культура в экспоненциальной или стационарной фазе роста. Инактивация Cch1 у клеток *pmc1*-Δ в экспоненциальной фазе частично восстанавливала способность дрожжей справляться с повышением $[Ca^{2+}]_{цит}$, тогда как в стационарной культуре ее эффект был противоположным. Снижение концентрации SDS до 0,004 % (МИК для *pmc1*-Δ) позволило клеткам *pmc1*-Δ в логарифмической фазе со временем стабилизировать уровень цитозольного кальция, в то время как нарушение *CCH1* у двойного мутанта р*mc1*-Δ *cch1*-Δ заметно снизило амплитуду ответа клеток на добавление SDS. У клеток *pmc1*-Δ *cch1*-Δ в стационарной фазе наоборот амплитуда подъема $[Ca^{2+}]_{цит}$ выше, чем у *pmc1*-Δ. Однако со временем у клеток с нарушением Pmc1 $[Ca^{2+}]_{цит}$ начинает стремительнее расти, чем у клеток двойного мутанта.

Стоит отметить, что в основном нарушение Cch1 не снижало амплитуду ответа клеток на SDS. Это говорит о том, что SDS-индуцированный приток Ca^{2+} не требует канала Cch1. Вместе с тем его инактивация в некоторой степени восстанавливала способность мутанта с нарушением АТФазы Pmc1 противостоять повышению $[Ca^{2+}]_{цит}$ в ответ на воздействие SDS. Это подразумевает наличие дополнительной функции Cch1 помимо транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану.

Литература

1. Lange M., Peiter E. Calcium Transport Proteins in Fungi: The Phylogenetic Diversity of Their Relevance for Growth, Virulence, and Stress Resistance // Frontiers in Microbiology. 2020. Vol. 10. P. 1–14.

2. Fokina A., Sokolov S. et al. Inactivation of Pmc1 vacuolar Ca^{2+} ATPase causes G_2 cell cycle delay in Hansenula polymorpha // Cell Cycle. 2012. Vol. 11 (4). P. 778–784.

3. Kulakova M. V., Karginov A. V. et al. The GEM-GECO Calcium Indicator Is Useable in *Ogataea parapolymorpha* Yeast, but Aggravates Effects of Increased Cytosolic Calcium Levels // Intern. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23 (17). P. 10004.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-252

ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОГО ШТАММА *E. COLI*, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН САХАРАЗЫ SACB, ПРИ ПОМОЩИ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

GETTING A GENETICALLY MODIFIED STRAIN OF *E. COLI* EXPRESSING THE SACB SACCHARASE GENE WITH THE USE OF MOBILE GENETIC ELEMENTS

В. В. Куликов [1], Д. Н. Щербаков [1,2], Е. А. Колосова [1,2]

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

V. V. Kulikov [1], D. N. Shcherbakov [1,2], E. A. Kolosova [1,2]

[1] *Altai State University, Barnaul*
[2] *State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo*

✉ coolervvk@gmail.com

Аннотация

Ряд ДНК-вакцин разрабатывается на основе плазмид. Устойчивость к антибиотикам применяется для селекции и удержания плазмидной ДНК в микроорганизмах. Однако требования к производству вакцин исключают антибиотики и устойчивые микроорганизмы. Альтернативным маркером может стать фермент сахараза. Методами генной инженерии с применением CRISPR/Cas был получен генно-модифицированный штамм *E. coli* с экспрессией гена SacB, способный обеспечить селекцию без антибиотиков.

Abstract

A number of DNA vaccines derives from plasmids. Antibiotic resistance is used for selection and containment of plasmid DNA in microorganisms. However production requirements of vaccine exclude of antibiotics and resistant microorganisms. As an alternative marker the enzyme sucrose can be used. A genetically modified strain of E. coli with sacB gene expression, which is capable of providing antibiotic-free breeding was obtained by genetic engineering using CRISPR/Cas.

ДНК-вакцины и терапевтические средства зачастую разрабатываются на основе плазмид и применяются на людях, животных, птицах и рыбах. Такие маркеры устойчивости к антибиотикам позволяют селективно удерживать плазмидную ДНК во время бактериальной ферментации и являются наиболее часто используемым селектируемым маркером.

В целях обеспечения безопасности регулирующие органы рекомендуют исключить маркеры устойчивости к антибиотикам из терапевтических и вакцинных плазмидных ДНК-векторов. Присутствие гена устойчивости к антибиотикам в составе плазмиды регулирующие органы считают нежелательным по причине: 1) потенциальной передачи устойчивости к антибиотикам эндогенной микробной фауне; 2) потенциальной активации и транскрипции генов с промоторов млекопитающих после клеточного включения в геном.

Кроме того, использование антибиотиков в ферментационной культуре требует дорогостоящей проверки процесса удаления антибиотиков во время очистки плазмиды, чтобы предотвратить загрязнение конечного продукта остаточными антибиотиками.

Альтернативным маркером для проведения селекции может служить использование генов, кодирующих фермент левансахараза. Ген *Bacillus subtilis* sacB кодирует секретируемый фермент левансахараза. У таких грамотрицательных бактерий, как *E. coli*, экспрессия гена sacB в присутствии сахарозы приводит к летальному исходу.

В настоящем исследовании подробно описаны протоколы, клонирования и тестирования векторов для доставки компонентов системы CRISPR/Cas, а также интегрируемого посредством транспозона гена SacB в клетки.

Интеграция гена SacB в геном была осуществлена посредством системы INTEGRATE с использованием эффекторного комплекса Cas678 из системы CRISPR-Cas типа IF из *Vibrio cholerae HE-45*, а также транспозазы TnsABC-TniQ, которая отвечает за гидролиз ДНК и транспозицию участка мобильного элемента, располагающегося между последовательностями узнавания (плечи транспозонов) в донорной плазмиде. Сайт транспозиции определяется последовательностью направляющей РНК, связанной с комплексом Cas678.

Система позволяет интегрировать длинные последовательности (до 10Kb) в геном грамотрицательных организмов, таких как *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* и *Pseudomonas putida* [1]. Вставка в геном была под-

© В. В. Куликов, Д. Н. Щербаков, Е. А. Колосова, 2024

тверждена секвенированием. Полученный ГММ штамм оценивался на чувствительность к сахаразе, в среде LB-Medium без NaCl с добавлением сахарозы 6 % от общего объема среды рост культуры отсутствовал.

При параллельной трансформации ГММ *E.coli* плазмидой pVEA, содержащей участок, кодирующий интерферирующую РНК, блокирующую РНК с гена SacB, на среде с сахарозой наблюдается множество колоний, что позволяет убедиться в корректной работе гена SacB в полученном ГММ штамме 10-beta/SacB, а также эффективном блокировании гена сахаразы плазмидой pVEA, что позволяет осуществлять отбор клеток, получивших плазмиду.

Таким образом, был получен генно-модифицированный штамм E. coli 10-beta/SacB, экспрессирующий ген сахаразы SacB. Проведена оценка чувствительности полученного штамма к сахарозе. Полное подавление роста культуры происходит при достижении концентрации сахарозы в среде 6 %. Показано, что при трансформации плазмидой, блокирующей ген сахаразы, генно-модифицированный штамм E. coli 10-beta/SacB растет в среде, содержащей сахарозу.

Литература

1. Pechenov P. Y. et al. New effective method of *Lactococcus* genome editing using guide RNA-directed transposition // Intern. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 22. P. 13978.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-253

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ, МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФАЙЛИНГА И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ РЕПОРТЕРОВ *

IDENTIFICATION OF DRUG MECHANISMS OF ACTION USING HIGH THROUGHPUT MICROSCOPY, MORPHOLOGICAL PROFILING AND FLUORESCENT REPORTERS

Т. Д. Лебедев[1,2], А. М. Михеева[1,2], М. А. Богомолов[1,2], М. В. Семенцов[1,2], V. A. Gasca[1,2], П. В. Спирин[1,2], А. А. Буздин[2,3], В. С. Прасолов[1,2]

[1] *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*
[2] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[3] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

T. D. Lebedev[1,2], A. M. Mikheeva[1,2], M. A. Bogomolov[1,2], M. V. Sementsov[1,2], V. A. Gasca[1,2], P. V. Spirin[1,2], A. A. Buzdin[2,3], V. S. Prasolov[1,2]

[1] *Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[3] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*

✉ lebedevtd@gmail.com

Аннотация

В нашей работе мы разработали подход, основанный на использовании флуоресцентных красителей клеточных структур и репортеров активности киназ, автоматизированной микроскопии и алгоритмов распознавания изображений, для определения механизмов действия противоопухолевых препаратов, изучения механизмов гибели клеток, формирования резистентности и поиска новых эффективных комбинаций ингибиторов.

Abstract

In our work, we have developed a method based on the use of fluorescent dyes for cellular structures and kinase activity reporters, automated microscopy and image recognition software to identify antitumor drugs mechanisms of action, study the processes of cell death, resistance acquirement and development of new effective combinations of inhibitors.

Несмотря на существенный прогресс в области разработки лекарств и методов терапии, онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности. За последние десятилетия были открыты сотни новых лекарственных препаратов, которые обладают противоопухолевой активностью. Особое развитие получило применение таргетных низкомолекулярных ингибиторов, которые воздействуют на конкретные белки-мишени или клеточные процессы. В настоящее время существует несколько сотен противоопухолевых таргетных препаратов, которые показали эффективность в клинических испытаниях, однако в настоящий момент они могут быть использованы для терапии менее 30 % пациентов. Это связано с несколькими причинами: 1) сложность в подборе новых селективных ингибиторов для конкретной мишени, 2) недостаточное понимание механизмов действия уже существующих ингибиторов в отношении определенного типа опухолей, 3) развитие резистентности к ингибиторам. Так, одной из проблем является то, что низкомолекулярные соединения могут воздействовать с десятками белков-мишеней, и эти взаимодействия будут зависеть от природы клеток. Это существенно усложняет перепрофилирование лекарственных препаратов, которые эффективно воздействуют на одни типы опухолей, но в клетках другого типа могут иметь совершенно другие мишени.

Для решения этих проблем сейчас исследуют изменения транскриптома, протеома, профилей фосфорилирования белков, эпигенетических и метаболических изменений. Такие методы позволяют провести многопараметрический анализ воздействия ингибиторов на различные клеточные процессы. Однако эти методы являются дорогостоящими и требуют существенных затрат времени и реактивов, что усложняет проведение широкомасштабных исследований большого количества лекарственных препаратов или использование различных клеточ-

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-74-10103).

© Т. Д. Лебедев, А. М. Михеева, М. А. Богомолов, М. В. Семенцов, V. A. Gasca, П. В. Спирин, А. А. Буздин, В. С. Прасолов, 2024

ных моделей злокачественных заболеваний. Одним из новых подходов для многопараметрического анализа клеточных процессов является морфологический профайлинг. Этот метод основан на использовании флуоресцентных красителей клеточных структур, автоматизированной микроскопии и использовании современных методов распознавания изображений и анализа больших данных. Преимуществами данного метода являются проведение измерений непосредственно для живых клеток, использование недорогих реактивов, возможность проведения широкомасштабных исследований и получение многопараметрических данных.

В нашей работе мы разработали собственный подход, основанный на методе морфологического профайлинга. Для исследования механизмов действия препаратов мы проводили окрашивание клеток под воздействием противоопухолевых препаратов на клеточные структуры: хроматин, тубулин, митохондрии, лизосомы; маркеры клеточной гибели: некроза, ферроптоза, апоптоза; а также использовали флуоресцентные репортерные белки для измерения активности киназ ERK1/2 и прогрессии клеточного цикла. На базе программ Cellpose и CellProfiler мы создали алгоритмы определения индивидуальных клеток с различной морфологией и клеточных структур на фотографиях, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа. Мы разработали алгоритмы обработки данных, которые учитывают более 900 морфологических параметров и позволяют оценивать изменения фенотипов клеток, что позволяет сравнивать действие ингибиторов на различные молекулярные подтипы злокачественных опухолей. Используя данные воздействия более 50 ингибиторов и фотографии 5 млн индивидуальных клеток, мы показали возможность классификации низкомолекулярных ингибиторов с помощью данного метода. Использование флуоресцентного репортера активности киназ ERK1/2 позволило классифицировать действие 37 ингибиторов на активность ERK1/2 для 9 различных типов злокачественных заболеваний и определить наиболее эффективные комбинации лекарственных препаратов, основанные на ингибировании киназ ERK1/2. Интегрирование данных изменений морфологии, индукции клеточной гибели, активности ERK1/2 и прогрессии клеточного цикла позволяют детально изучить механизмы действия ингибиторов, определить потенциальные механизмы развития резистентности и подобрать наиболее эффективные сочетания препаратов. Таким образом, разработанный нами метод позволяет получить важную информацию для подбора препаратов с определенным механизмом действия для конкретного типа клеток, а также для определения механизмов действия новых ингибиторов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-254

НАКОПЛЕНИЕ ВНУТРИМИТОХОНДРИАЛЬНОГО КАЛЬЦИЯ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ НЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЯ НА РАЗВИТИЕ ПОВЫШЕННОЙ УТОМЛЯЕМОСТИ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ *

THE ACCUMULATION OF INTRAMITOCHONDRIAL FORMATION DURING FUNCTIONAL UNLOADING DOES NOT AFFECT THE DEVELOPMENT OF INCREASED FATIGUE OF THE SOLEUS MUSCLE

И. Д. Львова, Д. А. Сидоренко, С. А. Тыганов, К. А. Шарло

Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

I. D. Lvova, D. A. Sidorenko, S. A. Tyganov, K. A. Sharlo

Institute of Biomedical Problems RAS, Moscow

✉ irrrra1@yandex.ru

Аннотация

Предполагалось, что повышенная генерация АФК после первых суток функциональной разгрузки в *m. soleus* может привести к нарушению функций митохондрий и повышенной утомляемости мышцы. Выяснилось, что митохондриальные АФК на фоне 7-суточной функциональной разгрузки вносят вклад в накопление Ca^{2+} внутри митохондрий и окисление тропомиозина, но не оказывают существенного влияния на функциональные свойства *m. soleus* на фоне 7-суточной функциональной разгрузки.

Abstract

It was assumed that increased generation of ROS after the first day of functional unloading in *m. soleus* can lead to disruption of mitochondrial functions and increased muscle fatigue. It was found that mitochondrial ROS during a 7-day functional unloading contribute to the accumulation of Ca^{2+} inside mitochondria and tropomyosin oxidation, but do not have a significant effect on the functional properties of *m. soleus* against the background of 7-day functional unloading.

Известно, что уже после первых суток функциональной разгрузки митохондрии в камбаловидной мышце генерируют повышенное количество активных форм кислорода (АФК), и мы предположили, что при сохранении такого количества АФК на протяжении 7 суток у мышцы снижается устойчивость к утомлению. Избыток АФК может приводить к накоплению внутримитохондриального кальция [1], что, в свою очередь, может приводить к нарушению работы митохондрий и к повышенной утомляемости камбаловидной мышцы [2].

В рамках данной работы мы применили mito-TEMPO — препарат, снижающий содержание АФК в митохондриях, и проверили, сможет ли он предотвратить нарушение нормального функционирования митохондрий и повышение утомляемости мышцы.

Самцы крыс линии Wistar были случайным образом разделены на 3 экспериментальные группы по 16 животных в каждой: C — виварный контроль, 7HS — 7-суточная функциональная разгрузка с введением плацебо, 7HSM — 7-суточная функциональная разгрузка с ежедневым внутрибрюшинным введением миметика супероксиддисмутазы mito-TEMPO (1 мг/кг). Функциональная разгрузка моделировалась по методике Ильина — Новикова в модификации Morey — Holton [3, 4].

Через 7 дней эксперимента у крыс под наркозом (трибромэтанолом в 2-метил-2-бутаноле; 5 мл/кг веса 10%-го раствора) выделяли камбаловидную мышцу. Эвтаназия крыс осуществлялась методом нарушения целостности шейных позвонков под наркозом. Эксперимент был одобрен комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ ИМБП РАН. Индекс утомления определялся *ex vivo*: проводилась серия из 20 тетанических сокращений за одну минуту, с перерывом в 1 с между сокращениями. За индекс утомления брали силу сокращения после 20 повторений, деленную на максимальную силу сокращения, измеренную в течение всего теста. Внутримитохондриальный кальций определяли методом конфокальной микроскопии, используя окраску Rhod-2-AM (Invitrogen, США) с добавлением 0,001 % Pluronic. Также для оценки экспрессии мРНК параметров биогенеза митохондрий методом ПЦР-РВ из образцов ткани выделяли РНК и ДНК, а для оценки содержания окисленного тропомиозина была выделена тотальная белковая фракция.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-75-10048).

© И. Д. Львова, Д. А. Сидоренко, С. А. Тыганов, К. А. Шарло, 2024

Мы обнаружили, что индекс утомления камбаловидной мышцы был достоверно снижен относительно контроля как в группе 7HS, так и в группе с введением mito-TEMPO.

Интенсивность флуоресценции красителя внутримитохондриального кальция Rhod-2-AM в группе 7HS достоверно вдвое превышала значения группы С. При этом в группе 7HSM уровень интенсивности флуоресценции Rhod-2-AM был несколько ниже значений группы 7HS и не имел достоверных отличий ни от С, ни от 7HS.

После 7-суточной функциональной разгрузки доля окисленного тропомиозина достоверно выросла вдвое в сравнении с группой С. При этом в группе с введением mito-TEMPO уровень окисленного тропомиозина был достоверно ниже значений группы 7HS и не отличался от группы контроля.

Содержание мРНК ключевого регулятора биогенеза митохондрий PGC-1α в группе 7HS было вдвое ниже значений группы С в обеих экспериментальных группах. Такие же результаты наблюдались и для экспрессии мРНК IV комплекса дыхательной цепи митохондрий, включая как те, чьи гены кодируются в ядерном геноме, так и те, чьи гены кодируются в митохондриальном геноме. Содержание митохондриальной ДНК достоверно снизилось на 70 % в обеих вывешенных группах в сравнении с контролем.

Таким образом, мы показали, что после 7-суточной функциональной разгрузки задних конечностей крыс в их камбаловидных мышцах происходит достоверный рост внутримитохондриального кальция и уровня окисления тропомиозина. Введение миметика супероксиддисмутазы mito-TEMPO на фоне 7-суточной функциональной разгрузки частично предотвращает рост содержания внутримитохондриального кальция и окисления тропомиозина, но не влияет на параметры биогенеза митохондрий и функциональные параметры мышцы.

Литература

1. Baev A. Y., Vinokurov A. Y., Novikova I. N. et al. Interaction of Mitochondrial Calcium and ROS in Neurodegeneration // Cells. 2022. Vol. 11.

2. Walkon L. L., Strubbe-Rivera J. O., Bazil J. N. Calcium Overload and Mitochondrial Metabolism // Biomolecules. 2022. Vol. 12.

3. Morey-Holton E., Globus R. K., Kaplansky A., Durnova G. The hindlimb unloading rat model: literature overview, technique update and comparison with space flight data // Adv. Space Biol. Med. 2005. Vol. 10. P. 7–40.

4. Novikov V. E., Ilyin E. A. Age-related reactions of rat bones to their unloading // Aviat Space Environ Med. 1981. Vol. 52. P. 551–553.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-255

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТИЛ-ЗАВИСИМЫХ РЕСТРИКТАЗ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ПАТОГЕНЕЗОМ СИНДРОМА АЛЬЦГЕЙМЕРА

METHYLATION-DEPENDENT RESTRICTION ENDONUCLEASES FOR THE ANALYSIS OF METHYLATION IN PROMOTER REGIONS OF GENES ASSOCIATED WITH THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S SYNDROME

В. Г. Мартюшова, А. М. Тимофеева, С. Е. Седых

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

V. G. Martyushova, A. M. Timofeeva, S. E. Sedykh

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

✉ vladislavamartyusova@gmail.com

Аннотация

Метилирование ДНК играет важную роль в эпигенетическом наследовании. Показано, что метилирование промоторных участков генов, связанных с патогенезом болезни Альцгеймера, изменяется в ходе развития заболевания. В данной работе для анализа этого процесса использована метил-зависимая эндонуклеаза рестрикции и количественная ПЦР.

Abstract

DNA methylation plays an important role in epigenetic inheritance. Methylation of promoter regions of genes associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease has been shown to change during the development of the disease. In this work, a methylation-dependent restriction endonuclease and qPCR were used to analyse this process.

Метилирование ДНК является одним из наиболее подробно изученных механизмов эпигенетической наследственности. Известно, что метилирование промоторных участков определенных генов может значительно различаться в норме и при болезни Альцгеймера, а также других нейродегенеративных и аутоиммунных патологиях. В данной работе использовали одну из известных мышиных моделей болезни Альцгеймера.

Для анализа локус-специфического метилирования использовали метил-зависимую рестриктазу Gla I (Сибэнзайм) и количественную полимеразную цепную реакцию. Данная рестриктаза узнает сайт R(5mC)↑GY / YG↓(5mC)R.

В базе данных Ensembl выбрали дифференциально метилированные области промоторов нескольких генов, содержащие метилирования, к выявленным областям подобрали праймеры. Геномную ДНК, выделенную из различных участков головного мозга контрольных и экспериментальных животных, обрабатывали Gla I и проводили ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Положительный сигнал ПЦР свидетельствует об отсутствии метилирования на исследуемом участке ДНК, поскольку в этом случае не происходит гидролиза ДНК на участке между парами праймеров.

Данный подход позволяет определить наличие или отсутствие сайтов метилирования без использования секвенирования, в две стадии. Сравнение метилирования промоторных участков генов, связанных с патогенезом болезни Альцгеймера, позволяет оценить их вклад в развитие данной нейродегенеративной патологии.

© В. Г. Мартюшова, А. М. Тимофеева, С. Е. Седых, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-256

ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ КРАЙНЕГО СЕВЕРА РФ К БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РИСКА *

PREDISPOSITION OF THE POPULATION OF THE FAR NORTH OF THE RUSSIAN FEDERATION TO BRONCHIAL ASTHMA: GENETIC RISK MARKERS

И. В. Марченко, К. В. Афоничева, М. В. Смольникова

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера,
ФИЦ «Красноярский научный центр СО РАН»

I. V. Marchenko, K. V. Afonicheva, M. V. Smolnikova

Scientific Research Institute of Medical Problems of the North,
Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center" SB RAS

✉ smarinv@yandex.ru

Аннотация

Исследованы полиморфные варианты генов лектинового пути активации системы комплемента (*MBL2, FCN2, MASP2*) у коренных популяций Крайнего Севера (ненцы, долганы-нганасаны, русские) с целью выявления у них маркеров риска формирования и развития обострений болезней органов дыхания на примере бронхиальной астмы.

Abstract

Polymorphic variants of the genes of the lectin activation pathway of the complement system (*MBL2, FCN2, MASP2*) in indigenous populations of the Far North (Nenets, Dolgan-Nganasan, Russian) were studied in order to identify risk markers for the formation and development of exacerbations of respiratory diseases on the example of bronchial asthma.

Бронхиальная астма (БА) — одно из самых распространенных заболеваний органов дыхания (БОД), является мультифакториальным: в его развитии участвуют факторы окружающей среды и генетические факторы. Потенциальным фактором генетической предрасположенности к этому заболеванию является полиморфизм генов лектинового пути активации системы комплемента и варианты, ассоциированные с дефицитом лектинов [1]. По данным официальной статистики, заболеваемость БОД в таких северных регионах, как Архангельская, Мурманская области, Республика Карелия, Республика Коми, Республика Саха (Якутия) и Ямало-Ненецкий автономный округ, на 26,6 % выше, чем в целом по России [2]. В связи с этим изучение изменений в структуре генов, кодирующих лектиновые белки, как потенциальных предрасполагающих факторов к обострению и формированию БА у населения Крайнего Севера является актуальным.

Целью работы было исследовать генетические особенности пришлых и коренных популяций Крайнего Севера (ненцы, долганы-нганасаны, русские) для выявления маркеров предрасположенности к бронхиальной астме среди генотипов и аллелей однонуклеотидных полиморфизмов генов лектинового пути активации комплемента (rs7096206, rs11003125, rs5030737, rs1800451, rs1800450, rs7095891 гена *MBL2*, rs17549193, rs7851696 гена *FCN2* и rs72550870 гена *MASP2*).

В работе проведено выделение ДНК из цельной крови 400 детей с бронхиальной астмой, разделенных по степени тяжести (легкая степень n = 146, тяжелая степень n = 254), а также 229 образцов от детей без аллергопатологии (средний возраст 14,5 года) и новорожденных этнических групп: русские (n = 302), ненцы (n = 261) и долганы-нганасаны (n = 104). Генетическое тестирование проведено методом ПЦР в режиме реального времени (TagMan).

В ходе сравнительного анализа частот генотипов и аллельных вариантов генов лектинов применялись аддитивная, рецессивная и доминантная модели наследования, а также регрессионный анализ с поправкой на пол и возраст. В результате работы установлены генетические маркеры предрасположенности к бронхиальной астме, связанные с врожденным дефицитом компонентов лектинового пути активации комплемента: генотип XX rs7096206 в промоторном регионе, генотипы AC и CC rs18000451 в первом экзоне, генотипы PP и PQ rs7095891

* Исследование выполнено в рамках темы государственного задания «Исследование молекулярно-клеточных механизмов регуляции иммунного ответа и взаимодействия иммунной системы с другими системами организма у жителей Восточной Сибири», ЕГИСУ № 124020100065-3.

© И. В. Марченко, К. В. Афоничева, М. В. Смольникова, 2024

в 5’-нетранслируемой области полиморфного гена *MBL2*, — эти варианты значимо чаще встречаются у больных астмой, в том числе с тяжелой формой заболевания.

В текущем исследовании показано, что дефицитные варианты генов лектинов в целом реже встречаются среди коренных популяций Крайнего Севера, чем у русских (см. таблицу). Вероятными причинами этого являются географическая изоляция ввиду проживания в удаленных регионах Сибири, а также «эффект основателя», когда частота распределения исторически молодой мутации между континентами и народностями связана с популяционно-генетическими процессами, не включающими естественный отбор.

Распространенность дефицитных вариантов генов лектинов среди коренных популяций Крайнего Севера, % (n)

Полиморфизм и генотип	Русские, n = 302	Ненцы, n = 261	Долганы-нганасаны, n = 104
MBL2 rs5030737: DD	1,0 (3)	0,0 (0)	0,0 (0)
MBL2: комбинированный генотип AO	28,7 (83)	16,9 (44)	19,2 (20)
FCN2 rs17549193: CT	51,4 (146)	29,9 (78)	34,6 (36)
FCN2 rs7851696: TT	1,0 (3)	0,8 (2)	0,0 (0)
MASP2 rs72550870: AG	6,3 (19)	0,4 (1)	0,9 (1)

Примечание. Указаны значения с $p \leqslant 0{,}01$.

В то же время у коренных популяций (ненцы и долганы-нганасаны) значимо чаще встречаются варианты, которые, как указано выше, являются предполагаемыми маркерами риска развития астмы и ее тяжелой формы: генотип XX rs7096206 и генотип PP rs7095891 *MBL2*. Это может быть одним из факторов того, что население территорий Крайнего Севера подвержено большему риску развития БОД по сравнению с остальными регионами РФ. Полученные результаты можно использовать для оптимизации неонатального скрининга с помощью выявления указанных генетических маркеров развития бронхиальной астмы у населения Крайнего Севера, в частности в популяциях ненцев и долган-нганасан.

Литература

1. Смольникова М. В., Терещенко С. Ю. Дефицит протеинов лектинового пути активации системы комплемента у населения Арктических территорий // Иммунология. 2023. Т. 44, № 4. С. 455–463.

2. Самородская И. В., Болотова Е. В., Дудникова А. В. Динамика и структура смертности от болезней органов дыхания и COVID-19 в Российской Федерации за 2019–2021 гг. // Клиническая медицина. 2023. Т. 100. С. 535–539.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-257

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОГРЕССИИ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС У МЫШЕЙ С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ *

MOLECULAR-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF LEWIS LUNG CARCINOMA PROGRESSION IN MICE WITH DIFFERENT HYPOXIA TOLERANCE

М. А. Маяк, Д. Ш. Джалилова, О. В. Макарова

НИИ морфологии человека им. акад. А. П. Авцына,
Российский научный центр хирургии им. акад. Б. В. Петровского, Москва

M. A. Maiak, D. Sh. Dzhalilova, O. V. Makarova

Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow

✉ juliajal93@mail.ru

Аннотация

В работе с использованием морфологических и молекулярно-биологических методов проведено исследование опухолевой прогрессии карциномы легкого Льюис у животных с разной устойчивостью к недостатку кислорода. Выявлен более выраженный провоспалительный фенотип у низкоустойчивых к гипоксии животных, а у высокоустойчивых — более высокий митотический индекс опухолей. Различий площади метастазов в легких не обнаружено.

Abstract

In the present study the features of progression of Lewis lung carcinoma in animals with low and high hypoxia resistance were characterized using morphological and molecular-biological methods. A more pronounced pro-inflammatory phenotype was identified in low resistant to hypoxia animals, a higher mitotic index of primary tumors was found in high resistant to hypoxia animals. There were no differences in metastasis between two groups.

Условия гипоксии играют важнейшую роль на всех этапах развития солидных опухолей, оказывая влияние на пролиферацию, метаболизм опухолевых клеток, ангиогенез, иммунный ответ. Гипоксия в опухоли является фактором неблагоприятного прогноза, так как способствует опухолевой прогрессии, увеличивая метастатический потенциал опухолевых клеток и формируя резистентность к терапии. Ранее нами показано, что течение воспалительных реакций и инициация опухолей зависят от индивидуальной устойчивости к недостатку кислорода [1, 2]. Однако вопрос об особенностях метастазирования опухолей у высокоустойчивых (ВУ) и низкоустойчивых (НУ) к гипоксии животных остается открытым.

Исследование проведено на самцах мышей линии C57BL/6 массой тела 20–22 г, разделенных на ВУ и НУ к гипоксии по «времени жизни» на «высоте» 10 000 м в барокамере. Через месяц после определения устойчивости к гипоксии ВУ (n = 30) и НУ (n = 27) животным подкожно вводили 5 млн клеток карциномы легкого Льюис (LLC) в область правой подмышечной впадины. В ходе эксперимента отслеживали гибель мышей. Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом на 21-е (по 12 мышей из каждой группы) и 28-е сутки (14 ВУ и 12 НУ мышей) после введения клеток LLC. Проводили забор крови из шейных вен для лабораторного анализа крови и проточной цитофлуориметрии. Получали первичный опухолевый узел и правое легкое для проведения морфологического исследования. В подкожных опухолях оценивали митотический индекс, в легких на серийных ступенчатых срезах с использованием программного обеспечения ImageJ вычисляли площади, занимаемые метастазами. В тканях печени определяли экспрессию генов *Hif1a*, *Nfkb*, *Tnfa*, *Tgfb*, *Il1*, *Il6*, *Il10* методом ПЦР-РВ относительно уровня экспрессии *Gapdh*.

Гибель ВУ и НУ животных составила 13,4 и 11,2 % соответственно. У 4 ВУ и 2 НУ животных опухоли не обнаружены. На 21-е сутки после трансплантации опухолевых клеток метастазы обнаружены у 4 из 12 ВУ (33,3 %) и у 4 из 12 НУ (33,3 %) к гипоксии животных, а на 28-е сутки — у 9 из 14 ВУ (64,3 %) и 7 из 12 НУ (58,3 %) мышей. Статистически значимых различий по перечисленным показателям между двумя группами не обнаружено. По данным лабораторного анализа крови у ВУ и НУ к гипоксии мышей на 28-е сутки эксперимента по сравнению с контрольными группами обнаружено повышение абсолютного числа лейкоцитов, моноцитов и гранулоцитов,

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 122030200530-6.

© М. А. Маяк, Д. Ш. Джалилова, О. В. Макарова, 2024

снижение процентного содержания лимфоцитов, повышение процентного содержания гранулоцитов. У животных обеих групп обнаружено снижение числа эритроцитов и содержания гемоглобина крови по сравнению с контрольными группами: у ВУ животных на 21-е и 28-е, у НУ — только на 28-е сутки эксперимента. По данным проточной цитометрии относительное и абсолютное число цитотоксических Т-лимфоцитов, Т-хелперов, NK-клеток и В-лимфоцитов в периферической крови ВУ и НУ мышей экспериментальных и контрольных групп не различалось. Обнаружено повышение абсолютного количества CD11b+ моноцитов в крови НУ мышей на 28-е сутки по сравнению с контролем. Как на 21-е, так и на 28-е сутки эксперимента по данным анализа пролиферативной активности первичных подкожных опухолей обнаружен более высокий митотический индекс клеток опухоли у ВУ к гипоксии животных. Статистически значимой разницы по показателю площади метастазов в легких между ВУ и НУ мышами не обнаружено в оба срока эксперимента. Экспрессия мРНК маркера ответа на гипоксию *Hif1a* и воспалительного фактора *Nfkb* в печени на 28-е сутки эксперимента была выше у НУ к гипоксии животных. Только в группе НУ мышей обнаружено повышение экспрессии гена *Nfkb* на 28-е сутки эксперимента по сравнению с 21-ми сутками. У НУ к гипоксии животных обнаружена более высокая по сравнению с ВУ активация экспрессии провоспалительного цитокина *Tnfa* (на 21-е и 28-е сутки эксперимента) и противовоспалительного *Tgfb* (на 28-е сутки). Только у НУ мышей обнаружено повышение экспрессии *Tnfa* и снижение экспрессии *Tgfb* на 21-е сутки эксперимента по сравнению с контрольной группой. Статистически значимых изменений экспрессии *Il1*, *Il6* и *Il10* в печени не выявлено.

Таким образом, прогрессия и метастазирование карциномы легкого Льюис у НУ к гипоксии мышей отличается более выраженным провоспалительным фенотипом: более высокой экспрессией мРНК *Hif1a, Nfkb, Tnfa, Tgfb* в печени. ВУ к гипоксии животные характеризуются более высоким митотическим индексом первичных подкожных опухолей. При этом различий в площади метастазов в легких между группами не выявлено.

Литература

1. Dzhalilova D. Sh., Zolotova N.A., Mkhitarov V.A. et al. Morphological and molecular-biological features of glioblastoma progression in tolerant and susceptible to hypoxia Wistar rats // Scientific Reports. 2023. Vol. 13 (1). P. 12694.

2. Fridman I.A., Ponomarenko E.A., Makarova O.V. et al. Morphological Characteristic of Melanoma B16 Progression in C57BL/6 Mice with High and Low Resistance to Hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2020. Vol. 168 (3). P. 390–394.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-258

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ PAX4, СВЯЗАННЫХ С МОНОГЕННЫМ ДИАБЕТОМ MODY9 *

COMPARATIVE ACTIVITY OF ALTERNATIVE AND MUTANT VARIANTS OF THE PAX4 TRANSCRIPTION FACTOR ASSOCIATED WITH MONOGENIC DIABETES MODY9

А. И. Мельникова[1,2], Т. С. Краснова[1], П. М. Рубцов[1]

[1] *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*
[2] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*

A. I. Melnikova[1,2], T. S. Krasnova[1], P. M. Rubtsov[1]

[1] *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow*
[2] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ anyakuznetsova5@mail.ru

Аннотация

В настоящее время фактор транскрипции PAX4 рассматривается как один из ключевых элементов в разработке новых методов лечения сахарного диабета. В данной работе суммированы результаты исследования альтернативных и мутантных вариантов данного гена.

Abstract

The PAX4 transcription factor is considered as one of the key elements in the development of new treatments for diabetes mellitus. This paper summarizes the results of the study of the alternative and mutant variants of this gene.

PAX4 — фактор транскрипции, участвующий в развитии инсулин-продуцирующих β-клеток поджелудочной железы на стадии эмбрионального развития и обеспечивающий их пластичность уже в зрелом возрасте. Мутации в гене PAX4 приводят к диабету типа MODY. Способность фактора активировать пути пролиферации и защищать клетки от апоптоза указывает на него как на один из ключевых элементов в разработке новых методов лечения сахарного диабета, направленных на регенерацию эндогенной массы β-клеток [1]. N-конец белка PAX4 отвечает за связывание с ДНК, С-конец характеризуется наличием трансактиваторного домена и домена с отрицательной регуляцией, наделяющий PAX4 функцией репрессора транскрипции [2]. Существует несколько изоформ PAX4, отличающихся друг от друга N- и С-концевой областью и по-разному влияющих на активность инсулинового и глюкагонового промоторов. У пациентов с MODY9 ранее были обнаружены мутации R121W и R164W в гене PAX4, влияющие на его активность. Замена аминокислоты в ДНК-связывающем домене приводит к изменению его структуры, и мутантные варианты PAX4 выступают в качестве репрессора транскрипции [3, 4]. При секвенировании гена PAX4 у больных с симптомами MODY был обнаружен ряд новых мутаций R19W, D126G, R183C, T199I, G235V, C282R и A330V, которые попадают в различные области гена, тем самым могут проявлять различные функции. Цель данной работы — охарактеризовать альтернативные варианты гена PAX4 дикого типа, исследовать влияние новых мутаций на активность промоторов инсулина и глюкагона человека, а также оценить влияние мутантных вариантов на жизнеспособность клеток в условиях гипергликемического стресса.

Было показано, что С-концевая область PAX4 определяет его функцию в зависимости от типа клеток [5]. Мы получили восемь альтернативных вариантов кДНК PAX4 дикого типа. Они отличаются в участках, кодирующих С-конец, наличием или отсутствием первого экзона, а также полным или усеченным гомеодоменом. С помощью конструкции, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем инсулинового промотора, показано, что в клетках HEK293 изоформы PAX4, содержащие первый экзон, имеют значительно более высокую активность по сравнению с соответствующими вариантами, лишенными первого экзона. Установлено, что альтернативные варианты PAX4 дикого типа имеют более низкую активность на промоторах гена инсулина и глюкагона человека по сравнению с канонической формой. Кроме того, изоформа PAX4 дикого типа с делецией одного экзона проявляет доминантное действие и нарушает транслокацию белка в клеточное ядро.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124031800074-4).

© А. И. Мельникова, Т. С. Краснова, П. М. Рубцов, 2024

В промоторной области гена PAX4 существуют два высоко аффинных сайта связывания собственного гена, через которые он оказывает сильное негативное ауторегуляторное действие [6]. Мы получили конструкции, содержащие этот участок. Они будут использованы для дальнейшего анализа.

Большинство исследуемых мутаций R19W, D126G, R183C, T199I, G235V, C282R, A330V в гене PAX4 имеют более низкую активность на промоторе инсулина по сравнению с диким типом в клетках HEK293. Кроме того, такие мутации, как R19W, R121W, R164W и R183C, попадающие в консервативные ДНК-связывающие домены, снижают активность инсулинового промотора сильнее, чем остальные, однако не проявляют сильного доминантно-негативного действия. Мутантные варианты PAX4, такие как R121W, D126G, R164W, R183C, G235V, не препятствуют транслокации белка в ядро в клетках HEK293. С помощью метода XTT было показано, что в клетках крысиной инсулиномы INS-1E сверхэкспрессия PAX4 дикого типа увеличивает жизнеспособность клеток при обработке их высокой глюкозой (40мМ), в то время как экспрессия мутантных вариантов R19W и R121W значительно снижает жизнеспособность клеток в условиях стресса.

Литература

1. Lorenco P. et al. Therapeutic potential of pancreatic PAX4-regulated pathways in treating diabetes mellitus // Current Opinion in Pharmacology. 2018. Vol. 43. P. 1–10.

2. Lorenzo P. et al. The Diabetes-Linked Transcription Factor PAX4: From gene to functional consequences // Genes. 2017. Vol. 8. P. 101.

3. Shimajiri Y. et al. A missense mutation of Pax4 Gene (R121W) is associated with Type 2 Diabetes in Japanese // Diabetes. 2001. Vol. 50.

4. Plengvidhya N. et al. PAX4 Mutations in Thais with Maturity Onset Diabetes of the Young // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2007. Vol. 92. P. 7.

5. Fujitani Y. et al. Identification of a Portable Repression Domain and an E1A-Responsive Activation Domain in Pax4: a Possible Role of Pax4 as a Transcriptional Repressor in the Pancreas // Molecular and Cellular Biology. 1999. Vol. 19. P. 12.

6. Smith S.B. et al. Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter // Journal of Biological Chemistry. 2000. Vol. 275. P. 36910–36919.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-259

ВНЕХРОМОСОМНЫЕ КОЛЬЦЕВЫЕ ДНК РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ РАСТЕНИЙ: СОСТАВ, СТРУКТУРА И ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ВЫЯВЛЕННЫЕ НАНОПОРОВЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЕМ

EXTRACHROMOSOMAL CIRCULAR DNA OF PLANT RETROTRANSPOSONS: COMPOSITION, STRUCTURE AND ORIGIN REVEALED BY NANOPORE SEQUENCING

П. Ю. Меркулов[1,2], М. А. Серганова[1,2],
Г. А. Петров[2], И. В. Киров[1,2]

[1]Московский физико-технический институт, Долгопрудный
[2]Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва

P. Yu. Merkulov[1,2], M. A. Serganova[1,2],
G. A. Petrov[2], I. V. Kirov[1,2]

[1]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny
[2]All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow

✉ paulmerkulov97@gmail.com

Аннотация

Внехромосомные кольцевые ДНК (вкДНК) растений имеют различное геномное происхождение и могут быть продуцированы мобильными элементами (МЭ). Используя нанопоровое секвенирование вкДНК, мы провели анализ изменений состава и структуры вкДНК МЭ *A. thaliana* в различных условиях. Применение данного подхода для селекционной линии *S. lycopersicum,* в свою очередь, позволило обнаружить МЭ, возникшие в геноме в результате интрогрессии от *S. peruvianum*.

Abstract

Plant extrachromosomal circular DNA (eccDNA) have different genomic origins and can be produced by mobile elements (TEs). Using nanopore sequencing of eccDNA, we analyzed changes in the composition and structure of TE eccDNA of *A. thaliana* under different conditions. The application of this approach to *S. lycopersicum* breeding line allowed us to detect TEs that arose in the genome as a result of introgression from *S. peruvianum*.

Известно, что состав и продукция вкДНК являются динамическими процессами. Ранее результаты сравнительного анализа вкДНК в различных органах *Arabidopsis* продемонстрировали, что репертуар вкДНК находится под влиянием уникальных путей и механизмов, участвующих в продукции вкДНК в различных типах клеток [1]. Используя зебуларин в качестве деметилирующего агента и ингибитор PolII α-аманитин, мы создали условия для снижения метилирования ДНК у *A. thaliana*. Мы также применили к растениям со сниженным метилированием различные виды стресса (обработка флагеллином, тепловой стресс и абсцизовая кислота), ожидая активацию различных семейств МЭ. Проведя нанопоровое секвенирование вкДНК *A. thaliana*, мы обнаружили значительную продукцию вкДНК только в условиях теплового стресса, усиливающуюся в условиях деметилирования ДНК. Тем не менее нам удалось провести анализ структуры обнаруженных вкДНК, выявив полноразмерные и различные укороченные варианты молекул. Интересно, что соотношение вариантов вкДНК было отлично от тех, которые наблюдались у мутанта *A. thaliana ddm1*, что может означать, что репертуар вкДНК может существенно различаться между отдельными МЭ в зависимости от стрессовых условий и генетического фона. Кроме того, наши наблюдения свидетельствуют об ограниченности знаний об условиях, которые могут вызывать экспрессию МЭ и транспозиционную активность.

Томат (*S. lycopersicum*) был выбран нами в качестве другого объекта для изучения МЭ при помощи нанопорового секвенирования вкДНК. Известно, что межвидовая гибридизация широко использовалась для введения ценных генов из диких видов в геном различных линий и сортов томата [2]. Для выяснения того, может ли межвидовая интрогрессия привнести новые активные МЭ из других видов, мы провели нанопоровое секвенирование вкДНК и описали активность мобилома в реальном времени, которая наблюдалась в условиях деметилирования ДНК. Последовательности отдельных прочтений вкДНК позволили нам идентифицировать два семейства

© П. Ю. Меркулов, М. А. Серганова, Г. А. Петров, И. В. Киров, 2024

активных LTR-ретротранспозонов: *Salsa* и *Ketchup*. Полногеномным секвенированием изучаемой линии томата и сборкой ее генома было установлено, что МЭ данных семейств были интрогрессированы из *S. peruvianum*. Данные результаты демонстрируют то, как активные транспозоны могут быть введены в новый геном, а также могут сохранять активность в течение следующих нескольких поколений.

Таким образом, применением нанопорового секвенирования образцов ДНК, обогащенных вкДНК, нами продемонстрирована эффективность и широкие возможности для изучения мобильных элементов различных видов растений.

Литература

1. Peng H., Mirouze M., Bucher E. Extrachromosomal Circular DNA: A Neglected Nucleic Acid Molecule in Plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2022. Vol. 69, No. 102263.

2. Dominguez M., Dugas E., Benchouaia M. et al. The impact of transposable elements on tomato diversity // Nat. Commun. 2020. Vol. 11, No. 1. P. 4058.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-260

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ BPA НА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА HT-29

THE EFFECT OF LOW CONCENTRATIONS OF BPA ON THE MOLECULAR BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE HUMAN COLON ADENOCARCINOMA HT-29 CELL LINE

Е. А. Мирошниченко[1,2], М. Н. Диатроптова[1], А. С. Ефимушкина[1], А. М. Косырева[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 РУДН, Москва

E. A. Miroshnichenko[1,2], M. N. Diatroptova[1], A. S. Efimushkina[1], A. M. Kosyreva[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

✉ katerinamir10011@gmail.com

Аннотация

Согласно литературным данным, Бисфенол А может оказывать негативное влияние на состояние эпителия толстой кишки и приводить к развитию колоректального рака. В данном исследовании мы оценили выживаемость, цитотоксичность и уровень экспрессии ряда генов, сопряженных с пролиферацией опухоли и метастазированием, в культуре клеток аденокарциномы человека HT-29 при инкубации с бисфенолом А в концентрациях 5, 25 и 50 мкмоль/л.

Abstract

According to the literature, Bisphenol A can exert a negative influence on the colon epithelium and lead to the development of colorectal cancer. In this study, we assessed the survival, cytotoxicity, and expression level of a number of genes associated with tumor progression and metastasis in human adenocarcinoma HT-29 cell culture when incubated with bisphenol A at concentrations of 5, 25, and 50 μmol/L.

Введение. Бисфенол А (BPA) — эстроген-подобное вещество, широко используемое в качестве мономеров в производстве поликарбонатных пластиков, эпоксидных смол, бутылок для воды, облицовки консервных банок и упаковки для пищевых продуктов, термобумаги, а также медицинского оборудования. BPA относится к эндокринным дисрапторам, участвующим в развитии опухолевых (пролиферации, миграции, инвазии опухолевых клеток) и воспалительных процессов, модуляции иммунных реакций [1]. Аденокарцинома — наиболее частый вид колоректального рака (КРР), распространенность которого ежегодно растет, в том числе среди молодого населения [2]. Влияние BPA на развитие и прогрессирование КРР изучено недостаточно.

Целью нашей работы было исследование выживаемости, цитотоксичности и уровня экспрессии мРНК генов *CD44, PI3K, CDK1, p65, EGFR, VEGFA, TP53, ESR1a, ESR2b, HIF-1α, CDH1* в культуре клеток HT-29 (КРР) при инкубации с BPA в концентрациях 5, 25 и 50 мкмоль/л в течение 24 ч.

Материалы и методы. В исследовании использовали культуру клеток линии HT-29 аденокарциномы толстой кишки человека. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с L-глутамином (ПанЭко) с добавлением 10 % ФБС (Biosera) и 50 ед/мл антибиотика пенициллин-стрептомицин (ПанЭко) при 37 °С и 5 % CO_2 до вхождения клеток в фазу экспоненциального роста. К клеткам добавляли BPA в концентрации 5, 25 и 50 мкмоль/л и инкубировали в течение 24 ч. Оценку пролиферативной активности культуры HT-29 в норме и при воздействии на нее BPA проводили путем построения кривых роста. Клетки снимали с чашек Петри в течение 5 суток с разницей в 24 ч и подсчитывали на автоматическом счетчике клеток TC-20 (Bio-Rad Laboratories). Цитотоксичность BPA исследовали с помощью МТТ-теста. Для оценки оптической плотности (ОП) использовали микропланшетный ИФА-ридер при длине волны 490 нм. Клеточную жизнеспособность определяли как соотношение ОП клеток с BPA к ОП контроля, выраженное в процентах. Методом ПЦР-РВ определяли уровень экспрессии мРНК генов, сопряженных с пролиферацией опухолевых клеток — *CD44, PI3K, CDK1, p65, EGFR* — и ангиогенезом опухоли — *VEGFA*; гена-супрессора опухоли — *TP53*; генов к рецепторам эстрогена — *ESR1a и ESR2b*; а также мРНК

© Е. А. Мирошниченко, М. Н. Диатроптова, А. С. Ефимушкина, А. М. Косырева, 2024

генов фактора, индуцируемого гипоксией HIF-1α и маркера эпителиально-мезенхимального перехода *CDH1*. Полученные данные нормировали по GAPDH и обрабатывали в программе Statistica.

Результаты и обсуждение. В результате построения кривой роста опухолевых клеток культуры HT-29 по показателям оптической плотности не было обнаружено различий между контролем и группами с добавлением BPA в концентрациях 5, 25 и 50 мкмоль/л. Цитотоксичность, оцененная с помощью MTT-теста, между группами также не различалась. По данным анализа ПЦР-РТ, по сравнению с контрольной группой у группы с добавлением BPA 5 мкмоль/л отмечалось снижение экспрессии *CD44* и *CDK1*. По сравнению с группой с добавлением BPA в концентрации 5 мкмоль/л концентрация 25 мкмоль/л приводила к повышению уровня экспрессии мРНК *HIF-1α, CD44, p65, EGFR, VEGFA, TP53, CDK1*. При инкубации HT-29 с BPA в дозе 50 мкмоль/л отмечалось увеличение уровня экспрессии мРНК *HIF-1α, CD44, p65* по сравнению с дозой 5 мкмоль/л. Различий в экспрессии мРНК эстрогеновых рецепторов, с которыми может связываться BPA, выявлено не было, как и в экспрессии мРНК *CDH1*, низкие уровни которого коррелируют с неблагоприятным прогнозом при КРР. Таким образом, инкубация клеток культуры HT-29 с BPA в концентрации 25 мкмоль/л приводит к повышению экспрессии мРНК генов — участников метаболических путей, способствующих прогрессии опухоли и метастазированию.

Литература

1. Hahladakis J. N., Iacovidou E., Gerassimidou S. An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol-A present in plastic materials, components, and products // Integrated Environmental Assessment and Management. 2023. Vol. 9 (1). P. 45–62.

2. Constantinou V., Constantinou C. Focusing on colorectal cancer in young adults (Review) // Molecular and Clinical Oncology. 2023. Vol. 20 (1). P. 8.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-261

ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ КОМБИНАЦИЙ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМА ДЛЯ ЛИНИЙ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ И НЕЙРОБЛАСТОМЫ *

IDENTIFICATION OF THE MOST EFFECTIVE COMBINATIONS OF ANTICANCER DRUGS BASED ON TRANSCRIPTOME DATA FROM NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND NEUROBLASTOMA CELL LINES

А. М. Михеева [1,2], В. С. Прасолов [2], Т. Д. Лебедев [2]

[1] *Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2] *Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*

A. M. Mikheeva [1,2], V. S. Prasolov [2], T. D. Lebedev [2]

[1] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2] *Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow*

✉ alesyamikheeva@gmail.com

Аннотация

Таргетная терапия является перспективным направлением лечения злокачественных заболеваний. Правильно подобранные комбинации таргетных препаратов могут усиливать действие друг друга и повышать эффект от лечения. В данной работе рассмотрены наиболее эффективные комбинации препаратов с ингибитором SRC киназ Bosutinib, которые подобраны на основе данных транскриптома линий немелкоклеточного рака легких и нейробластомы под действием Bosutinib, и описаны изменения внутриклеточных структур, вызванные влиянием этих комбинаций.

Abstract

Targeted therapy is a promising direction in the treatment of malignant diseases. Properly selected combinations of targeted drugs enhance action of each other and enhance the effect of treatment. This work demonstrates the most effective combinations of drugs with the SRC kinase inhibitor bosutinib. These drugs selected on the basis of transcriptome data from non-small cell lung cancer and neuroblastoma lines treated of bosutinib, and also describes changes in intracellular structures caused by the influence of these combinations.

Число случаев онкологических заболеваний растет, что подчеркивает необходимость разработки современных и эффективных методов лечения. Химиотерапия зачастую не только не приводит к положительному эффекту, но и может вызвать пагубные необратимые процессы. Большой перспективой обладает метод таргетной терапии, которая характеризуется применением противораковых препаратов, нацеленных на конкретную молекулярную мишень. Известно, что в раковых клетках по сравнению со здоровыми значительно выше активность киназ семейства SRC. Ингибитор Bosutinib воздействует на киназы этого семейства и приводит к гибели клеток. Однако не исключено, что подавление конкретных молекулярных мишеней способствует активации сопутствующих сигнальных путей, которые могут спровоцировать развитие устойчивости к препарату. Действие на эти пути комбинацией препаратов позволит повысить эффективность лечения. Однако для этого необходимо сформулировать принцип отбора наиболее эффективных комбинаций.

На основе данных транскриптома линий немелкоклеточного рака легких (H1299) и нейробластомы (SH-SY5Y) мы выявили сигнальные пути, активность которых меняется в результате действия Bosutinib. В клетках H1299 подавляются пути, ответственные за миграцию, регуляцию клеточного цикла, ангиогенез и передачу сигнала. А также наблюдается повышение активности путей STAT, mTOR, ответственных за клеточную гибель, путей, с участием рецепторных тирозинкиназ VEGFR2, PDGFR, фосфатазы PTEN, участвующей в ДНК репарации, и p38 и GATA2, регулирующих процессы транскрипции и трансляции. В клетках нейробластомы SH-SY5Y под действием препарата Bosutinib значительно снизилась активность путей, ответственных за передачу сигнала, регулируемых Ret, KIT, и путей, влияющих на клеточную гибель, с участием VEGF и TNFR2, а также приостановлен синтез микротрубочек. Активация процессов, ответственных за синтез свободной формы железа, подтверждает гибель клеток.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-74-10103).

© А. М. Михеева, В. С. Прасолов, Т. Д. Лебедев, 2024

В данной работе мы провели оценку синергии совместного действия Bosutinib с препаратами иного действия. Выбор этих препаратов осуществляли на основе изменения активности сигнальных путей под влиянием Bosutinib. В результате мы выявили ряд наиболее эффективных комбинаций для линий немелкоклеточного рака легких и нейробластомы. Преимущественно мы наблюдали синергию с теми препаратами, действие которых направлено на сигнальные пути с повышенной активностью. Например, на линию немелкоклеточного рака легких оказывает эффект Sunitinib. Вероятно, это связано с тем, что в клетках повышена активность сигнальных путей с участием VEGFR и PDGFR, а также вызывали синергию PIM и Rapamycin, которые ингибируют активные сигнальные пути STAT и mTOR соответственно. Мы наблюдали синергичный эффект и для препарата Panobinostat. Для линии нейробластомы эффект синергии мы наблюдали для комбинации Bosutinib с Venetoclax.

Для того чтобы определить, какими именно процессами вызвана гибель клетки, мы сравнили изменения, происходящие с митохондриями, лизосомами, каспазами и свободной формой железа под действием монотерапии и препаратов в комбинации. В клетках нейробластомы комбинация препаратов Bosutinib и Venetoclax вызывают рост активности лизосом, что может свидетельствовать о некрозе клеток. Однако комбинации препаратов, действие которых также было направлено на мишени с высокой активностью, но не приводило к синергии, способствовали снижению миграции клеток друг к другу, вызванную Bosutinib. Результаты данной работы будут полезны при изучении совместного действия препаратов и их влияния на внутриклеточные процессы.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-262

РОЛЬ БЕЛКА ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА ВО ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ ТРАНСПОРТЕ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ *

THE ROLE OF PROMYELOCYTIC LEUKEMIA PROTEIN IN MAMMALIAN INTRACELLULAR CALCIUM TRANSPORT

М. В. Неклесова[1], С. А. Силонов[1], Е. Ю. Смирнов[1], Р. Р. Шарипов[2], А. М. Сурин[2], И. М. Кузнецова[1], К. К. Туроверов[1], А. В. Фонин[1]

[1]*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*
[2]*Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва*

M. V. Neklesova[1], S. A. Silonov[1], E. Y. Smirnov[1], R. R. Sharipov[2], A. M. Surin[2], I. M. Kuznetsova[1], K. K. Turoverov[1], A. V. Fonin[1]

[1]*Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg*
[2]*Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow*

✉ Neklesova.m@mail.ru

Аннотация

Известно, что белок промиелоцитарного лейкоза (PML) участвует в регуляции транспорта ионов кальция из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) в митохондрии. В настоящей работе исследовано влияние нокаута гена PML в клетках HeLa на внутриклеточный транспорт ионов кальция. Показано, что нокаут PML снижает базальный уровень Ca^{2+}, интенсифицирует высвобождение Ca^{2+} из ЭПР, увеличивает поступление Ca^{2+} в митохондрии и затрудняет деполяризацию митохондрий.

Abstract

Promyelocytic leukemia protein (PML) is known to be involved in the regulation of calcium ion transport from the endoplasmic reticulum (ER) to mitochondria. In this paper, the effect of PML gene knockout in HeLa cells on intracellular transport of calcium ions was investigated. It has been shown that PML knockout reduces the basal level of Ca^{2+}, intensifies the Ca^{2+} release from ER, increases the intake of Ca^{2+} into mitochondria and complicates the depolarization of mitochondria.

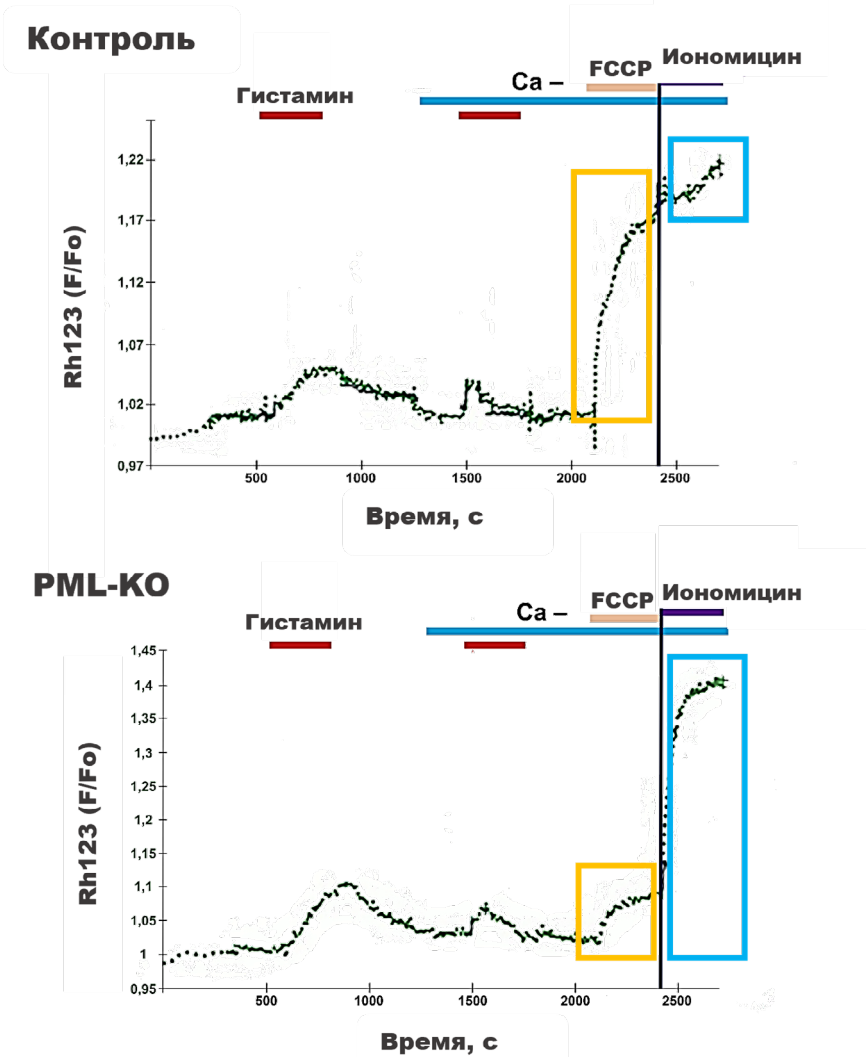
Ионы кальция играют важную роль в различных процессах, влияющих на клеточный метаболизм. Например, накопление Ca^{2+} способствует инициации клеточного старения, так как вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий и запускает выработку активных форм кислорода [1]. Известно, что пул PML, локализующийся в мембранах, ассоциированных с митохондриями (MAMs), участвует в регуляции активности инозитол-1,4,5-трисфосфатных рецепторов (IP3Rs) и, вследствие этого, в регуляции транспорта ионов кальция из люмена ЭПР в митохондрии [2]. В настоящей работе исследовано влияние нокаута гена PML в клетках HeLa на транспорт ионов кальция. Была получена клеточная линия HeLa с нокаутом гена PML (PML-KO) с использованием технологии CRISPR/Cas9.

Установлено, что как отношение интенсивностей флуоресценции при длинах волн регистрации 340/380 нм, так и суммарная интенсивность флуоресценции ратиометрического индикатора внутриклеточного кальция Fura-2 ниже в PML-KO клетках HeLa по сравнению с клетками дикого типа. Введение в исследуемые клетки агониста IP3Rs — гистамина — также приводило к существенному уменьшению анализируемых характеристик Fura-2 в нокаутных по PML клетках HeLa по сравнению с контрольными клетками. В совокупности это свидетельствует о более низком базальном уровне ионов кальция в клетках HeLa, нокаутных по PML, по сравнению с клетками дикого типа. При этом высвобождение Ca^{2+} из ЭПР в ответ на гистамин было значимо ($p < 0,05$) выше (на 41 %) в клетках PML-KO как в буфере с Ca^{2+}, так и в бескальциевом буфере. Это позволяет предположить, что нокаут PML вызывает активацию IP3Rs. Также установлено существенное (на 34 %) увеличение концентрации ионов кальция в митохондриях в нокаутных по PML клетках по сравнению с контрольными клетками, что свидетельствует об увеличенном захвате Ca^{2+} митохондриями в отсутствие PML. Кроме того, введение протонофора FCCP (1 μM), вызывающего деполяризацию митохондрий и потерю ими способности удерживать накопленный Ca^{2+},

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-15-00429).

© М. В. Неклесова, С. А. Силонов, Е. Ю. Смирнов, Р. Р. Шарипов, А. М. Сурин, И. М. Кузнецова, К. К. Туроверов, А. В. Фонин, 2024

вызывало значительно большее снижение интенсивности флуоресценции индикатора митохондриального потенциала — красителя Rh123 — в митохондриях клеток дикого типа по сравнению с PML-KO клетками. Несмотря на то что используемая концентрация FCCP должна была бы почти полностью деполяризовать митохондрии, полная деполяризация митохондрий в клетках PML-KO происходила только после введения в них ионофора иономицина (см. рисунок).



Изменения митохондриального потенциала (интенсивность флуоресценции Rh123) в клетках HeLa дикого типа (контроль) и в клетках с нокаутом гена PML (PML-KO)

В совокупности полученные данные позволяют заключить, что отсутствие PML вызывает снижение базального уровня Ca^{2+} в цитоплазме, увеличивает высвобождение ионов кальция из ЭПР и затрудняет деполяризацию митохондрий.

Литература

1. Martin N. et al. Regulation and role of calcium in cellular senescence // Cell Calcium. 2023. P. 102701.

2. Giorgi C. et al. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release // Science. 2010. Vol. 330, No. 6008. P. 1247–1251.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-263

ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ РЕПАРАЦИИ ДНК, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ОБРАЗОВАНИЕ ХРОМОСОМНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ *AML1-ETO* *

INVESTIGATION OF DNA REPAIR PATHWAYS INVOLVED IN FORMATION OF *AML1-ETO* CHROMOSOMAL TRANSLOCATION

Н. А. Николаев, В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

N. A. Nikolaev, V. S. Viushkov, N. A. Lomov

Lomonosov Moscow State University

✉ nnikolaev@fbb.msu.ru

Аннотация

С помощью NGS и клеточной линии с индуцируемой системой CRISPR/Cas, нацеленной на гены *AML1* и *ETO*, мы изучили репарацию двуцепочечных разрывов ДНК в норме и при образовании хромосомных транслокаций *AML1-ETO* и *ETO-AML1*. Мы сравнили встречаемость следов NHEJ и MMEJ. Транслокации сопровождаются в среднем более длинными делециями. Использование микрогомологий разнится от локуса к локусу, предположительно, по причине различных репертуаров микрогомологий.

Abstract

Using NGS and a cell line with inducible CRISPR/Cas system targeting *AML1* and *ETO* genes, we have studied DNA double-strand break repair in normal end joining and formation of chromosomal translocations *AML1-ETO* and *ETO-AML1*. We have compared the occurrence of NHEJ and MMEJ features. On average, translocations are characterized by longer deletions. Microhomology usage varies across loci. We suspect this to be due to differing repertoires of microhomologies.

Хромосомные транслокации часто выступают драйверными событиями онкогенеза [1, 2]. Чаще всего хромосомные транслокации возникают при ошибках репарации двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) путем негомологичного соединения концов (NHEJ) или репарации, опосредованной микрогомологией (MMEJ) [3].

Соединение концов путем NHEJ происходит либо без инделей (инсерций или делеций), либо с небольшими инделями. Для репарации путем MMEJ необходимы два участка микрогомологии (идентичной последовательности) по разные стороны от ДЦР. В результате MMEJ происходит делеция одного из двух участков и последовательности ДНК между ними [3]. Большая часть транслокаций в клетках человека несет следы NHEJ [3], однако NHEJ — сам по себе доминирующий путь репарации ДЦР у позвоночных [4], поэтому вопрос о склонности NHEJ и MMEJ к ошибочному соединению концов ДНК и образованию транслокаций остается открытым. Существуют данные, указывающие на то, что MMEJ чаще вовлечен в ошибочное соединение концов ДНК и образование хромосомных транслокаций (транс-репарацию), чем в правильное соединение (цис-репарацию) [5]. Эти результаты были получены на генно-инженерных репортерных конструкциях и требуют проверки применительно к клинически значимым перестройкам.

Ранее в нашей лаборатории на основе лимфобластоидной клеточной линии LCL была получена линия iAML-ETO, моделирующая транслокацию 8-й и 21-й хромосом с образованием химерного гена *AML1-ETO* [6]. Такая транслокация является нежелательным побочным эффектом противораковой терапии генотоксическими агентами, так как может запускать развитие крайне агрессивного индуцированного терапией лейкоза [2, 6]. Клетки линии iAML-ETO несут гены гидовых РНК к локусам генов *AML1* и *ETO* и ген нуклеазы Cas9 под контролем промотора системы Tet-ON. Наличие этой системы в геноме позволяет индуцировать ДЦР в целевых локусах в большинстве клеток в культуре и получать множество транслокаций, несмотря на то что перестройки сами по себе очень редки. С помощью данной линии мы оценили число событий NHEJ и MMEJ при цис- и транс-репарации.

Мы индуцировали в клетках экспрессию Cas9, через 72 ч выделили геномную ДНК и с помощью ПЦР амплифицировали как исходные локусы, в которые вносили разрывы, так и химерные последовательности ДНК, образованные в результате транс-репарации. Из ампликонов приготовили NGS-библиотеки, секвенировали их и выявили следы событий репарации в чтениях.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-24-20019).

© Н. А. Николаев, В. С. Вьюшков, Н. А. Ломов, 2024

Мы установили, что в ходе транс-репарации соединяемые концы ДНК теряют в среднем больше нуклеотидов (т. е. испытывают более интенсивную резекцию), чем в ходе цис-репарации. Это может объясняться тем, что перед ошибочным соединением концы ДНК на продолжительное время оказываются «потеряны» в клеточном ядре. Более интенсивная резекция концов должна способствовать их репарации путем MMEJ. С этим согласуется наше наблюдение, что, при рассмотрении последовательностей, несущих индели, транс-репарация чаще происходит с утратой участков микрогомологии (длиной 3–6 нуклеотидов), чем цис-репарация в локусе *AML1*. В случае гена *ETO* ситуация оказалась обратной: микрогомологии чаще утрачивались при цис-репарации, чем при транс-репарации. Мы связываем это с тем, что локус *ETO* гораздо богаче микрогомологичными участками, чем локус *AML1* или последовательности ДНК, образующиеся при транс-репарации.

Наши данные говорят о том, что механизм MMEJ в общем случае играет большую роль в транс-репарации, чем в цис-репарации, однако эта тенденция зависит от последовательности локуса, в котором возникают ДЦР. Полученные результаты важны для понимания механизмов репарации ДНК в клетке, в частности механизмов образования хромосомных транслокаций.

Литература

1. Wang J. H. Mechanisms and Impacts of Chromosomal Translocations in Cancers // Front. Med. 2012. Vol. 6 (3). P. 263–74.

2. Swerdlow S. H, Campo E., Harris N. L. et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2017. 585 p.

3. Bunting S. F., Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer // Nat. Rev. Cancer. 2013. Vol. 13 (7). P. 443–54.

4. Chang H. Y., Pannunzio N. R., Adachi N., Lieber M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. Vol. 18 (8). P. 495–506.

5. Weinstock D. M., Elliott B., Jasin M. A model of oncogenic rearrangements: differences between chromosomal translocation mechanisms and simple double-strand break repair // Blood. 2006. Vol. 107 (2). P. 777–780.

6. Shmakova A., Lomov N., Viushkov V. et al. Cell models with inducible oncogenic translocations allow to evaluate the potential of drugs to favor secondary translocations // Cancer Commun. 2023. Vol. 43 (1). P. 154–158.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-264

РОЛЬ KCNQ3 В ФОРМИРОВАНИИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И МОЗОЛИСТОГО ТЕЛА *

ROLE OF KCNQ3 IN THE FORMATION OF THE CEREBRAL CORTEX AND THE CORPUS CALLOSUM

А. Д. Охальников[1], М. С. Гавриш[1], С. А. Тутукова[1], В. С. Таробыкин[2]

[1] Научно-исследовательский институт нейронаук, Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского
[2] Институт клеточной биологии и нейробиологии, Медицинский университет Шарите, Берлин, Германия

A. D. Okhalnikov[1], M. S. Gavrish[1], S. A. Tutukova[1], V. S. Tarabykin[2]

[1] Research Institute of Neurosciences, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
[2] Institute of Cell Biology and Neurobiology, Charite Medical University, Berlin, Germany

✉ a11o20@mail.ru

Аннотация

Идентификация генов, вовлеченных в контроль развития коры головного мозга, является актуальной задачей. Совместно с коллегами мы оценили вклад субъединицы потенциал-зависимого K^+-канала (Kcnq3) в процессы формирования мозолистого тела, а также ее роль в миграции и определении клеточной судьбы нейрональных предшественников.

Abstract

Identification of genes involved in the control of the cerebral cortex development is an an important task. Together with colleagues, we assessed the contribution of the voltage-gated K^+ channel subunit (Kcnq3) to the formation of the corpus callosum, as well as its role in the migration and determination of the cell fate of neuronal progenitors.

Нарушения формирования коры головного мозга, в частности агенезия мозолистого тела, являются одной из наиболее часто встречающихся врожденных патологий развития нервной системы. В регуляции миграции нейронов и аксональной навигации учувствуют транскрипционные факторы, среди которых особое место занимают представители семейства Neurod [1, 2].

Для выявления мишеней транскрипционных факторов NeuroD нашими коллегами было выполнено РНК-секвенирование, по результатам которого были отобраны потенциальные гены-мишени, значительно снижающие свою экспрессию в тройном нокауте Neurod1/2/6. Одним из таких генов оказался *Kcnq3*, чья экспрессия в коре головного мозга мутантных мышей снизилась на ~ 96 %.

Белковым продуктом гена *Kcnq3* является субъединица потенциал-зависимого калиевого канала из семейства Kv7, которая присутствует преимущественно в клетках головного мозга. Совместно с другой субъединицей Kcnq3 образует гетеротетрамерные потенциал-зависимые калиевые каналы Kv7.2/7.3, физиологическая функция которых в постнатальном периоде заключается в создании М-токов, снижающих возбудимость нейронов [3]. Однако функции данного канала во время эмбрионального развития до сих пор остаются не изучены.

Недавнее исследование подтвердило, что другой представитель К-каналов принимает участие в навигации аксонов в периферической нервной системе, поэтому мы предположили, что Kcnq3 выполняет схожую функцию [4].

Ранее мы показали, что CRISPR/Cas9-зависимая инактивация *Kcnq3* в коре головного мозга мышей дикого типа линии C57BL/6 приводит к нарушению навигации аксонов. В результате этого аксоны мозолистого тела нарушают свою миграцию в ипсилатеральном полушарии и не пересекают среднюю линию между полушариями [5].

На следующем этапе работы мы оценили влияние повышения экспрессии гена *Kcnq3* на разные аспекты формирования коры головного мозга у мышей дикого типа линии C57BL/6. Для доставки генетического конструкта в клетки нейрональных предшественников использовали метод *in utero* электропорации. Желудочки мышиных эмбрионов инъецировали на 13,5-й день эмбрионального развития (E13.5), анализ фронтальных корональные срезов головного мозга проводили на стадии E18.5 при помощи иммуногистохимического анализа.

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № FSWR-2023-0029).

© А. Д. Охальников, М. С. Гавриш, С. А. Тутукова, В. С. Тарабыкин, 2024

По нашим результатам повышение экспрессии *Kcnq3* в коре головного мозга мышей дикого типа приводит к нарушению формирования мозолистого тела. Нарушается фасцикуляция пучка аксонов. Помимо этого, после пересечения средней линии аксоны покидают общий пучок и прорастают в верхние слои кортикальной пластинки. Дополнительно мы проанализировали послойное распределение нейрональных клеток для определения клеточной спецификации нейронов. Для этого проводили иммуногистохимическое окрашивание на маркеры верхних и нижних слоев коры головного мозга — Satb2 и CTIP2 соответственно. Повышение экспрессии *Kcnq3* приводит к ускорению миграции нейрональных предшественников. Также наблюдается смещение пропорции нейронов верхних и нижних слоев Satb2/CTIP2 в сторону Satb2.

Таким образом, мы показали, что *Kcnq3* необходим для правильного формирования мозолистого тела и участвует в процессах миграции и клеточной спецификации нейрональных клеток-предшественников. Однако задействованные молекулярные механизмы остаются неизвестными и требуют дальнейшего изучения.

Литература

1. Tutukova S., Tarabykin V., Hernandez-Miranda L. The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease // Front. Mol. Neurosci. 2021. Vol. 14.

2. Bormuth I., Yan K., Yonemasu T. et al. Neuronal Basic Helix–Loop–Helix Proteins Neurod2/6 Regulate Cortical Commissure Formation before Midline Interactions // J. Neurosci. 2013. Vol. 33. P. 641–651.

3. Zhou X., Song M. et al. Potential Role of KCNQ/M-Channels in Regulating Neuronal Differentiation in Mouse Hippocampal and Embryonic Stem Cell-Derived Neuronal Cultures // Exp. Neurol. 2011. Vol. 229, No. 2. P. 471–483.

4. Huang C-H., Lien C-C. et al. K+ Channel Kv3.4 Is Essential for Axon Growth by Limiting the Influx of Ca2+ into Growth Cones // J. Neurosci. 2017. Vol. 37, No. 17. P. 4433–4449.

5. Охальников А. Д., Гавриш М. С., Тутукова С. А. и др. Поиск мишеней neurod и их вклад в навигацию аксонов мозолистого тела // Биосистемы: организация, поведение, управление. Н. Новгород, Университет Лобачевского, 2024. 425 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-265

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАГОВЫХ DGR-КАССЕТ НА ПРИМЕРЕ ФАГА LMMB *

ANALYSIS OF PHAGE DGR CASSETTES ON THE BASIS OF THE EXAMPLE OF PHAGE LMMB

Е. А. Панина, И. В. Бабкин, В. А. Федорец, Н. В. Тикунова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

E. A. Panina, I. V. Babkin, V. A. Fedorets, N. V. Tikunova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ e.panina@g.nsu.ru

Аннотация

DGR-кассеты — это ретроэлементы, генерирующие разнообразие (DGR), недавно открытый класс ретроэлементов, которые используют обратную транскрипцию для создания огромного количества вариантов последовательностей в конкретных генах-мишенях. В лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН при исследовании образца вирома человека был обнаружен новый crAss-подобный геном, содержащий генерирующий разнообразие ретроэлемент.

Abstract

DGR cassettes are Diversity Generating Retroelements (DGRs), a recently discovered class of retroelements that utilize reverse transcription to generate a huge number of sequence variants in specific target genes. In the Laboratory of Molecular Microbiology of ICBFM SB RAS, a new crAss-like genome containing a diversity-generating retroelement was discovered during the study of a sample of human virome.

Исследование DGR-кассет является актуальным и представляет интерес как практический, так и фундаментальный, так как механизмы их работы все еще остаются недостаточно изученными. Стоит отметить, что наряду с исследованием механизмов приспособления фагов, несущих в себе эту структуру, к новым хозяевам возможно создание лабораторных систем направленной и ускоренной молекулярной эволюции, подобных «дисплейным».

Функциональная архитектура исследуемого нами фага LMMB отличается от строения DGR-кассеты, первоначально описанного в литературе фага BPP-1. Мы решили проверить, насколько распространена функциональная дифференциация среди фаговых DGR-кассет в целом. Так как лаборатория молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН располагает обширной коллекцией кишечных виромов человека, полученных из фекальных образцов здоровых доноров, мы исследовали данные, полученные после секвенирования всех полногеномных образцов из этой коллекции с помощью программного обеспечения MyDGR с целью обнаружить новые фаговые геномы, несущие в себе DGR-кассеты. В результате нашего исследования были обнаружены 14 последовательностей, определенных как DGR-кассеты. Функциональная архитектура этих кассет имеет видимые различия (см. таблицу), такие как:

1) наличие гена, кодирующего белок предполагаемой детерминанты связывания, — почти в половине последовательностей этот ген либо отсутствует, либо не может быть обнаружен, как и в изучаемой DGR-кассете фага LMMB;

2) расположение гена, кодирующего предполагаемую детерминанту связывания — если данный ген присутствует в последовательности, то, в соответствии с полученными данными, располагаться он может как перед геном, кодирующим обратную транскриптазу, так и после него. В DGR-кассете фага LMMB — после;

3) количество VR-зависимых таргетных генов — некоторые последовательности несут в себе два таргетных гена. DGR-кассета фага LMMB — один;

4) наличие шпилечных структур. В DGR-кассете фага LMMB они отсутствуют, как и во многих других кассетах.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 122110700002-2.

© Е. А. Панина, И. В. Бабкин, В. А. Федорец, Н. В. Тикунова, 2024

Характеристика обнаруженных DGR-кассет

Фаг	avd	Шпилька	Особенности
Vir14_NODE_1	–	–	
Vir26_NODE_4	–	–	
Vir14_NODE_2	+ (после RT) (CH_1)	–	
Vir22_NODE_5	+ (после RT) (CH_1)	–	
Vir19_NODE_8	+ (после RT) (PAG_1)	–	Два таргетных гена
Donor5_NODE_3	–	–	
Vir26_NODE_9	–	–	
Vir32_NODE_2	–	–	
Vir38_NODE_2	–	–	
Vir19_NODE_3	–	–	
Vir48_NODE_3	–	–	
Vir23_NODE_13	+ (после RT) (PAG_3)	+	Два таргетных гена
Vir29_NODE_64	+ (перед RT) (PAG_2)	+	
Vir28_NODE_8	+/– (после RT)	+	Два таргетных гена

Исходя из полученных данных, можно заключить, что фаговые DGR-кассеты обладают заметным структурным разнообразием.

Чтобы проверить особенности работы DGR-кассеты фага LMMB, были получены основные элементы DGR-кассет: 1) обратная транскриптаза (RT); 2) последовательность РНК, содержащая области TR и IMH (область инициации мутагенного хоминга); 3) РНК-праймер, комплементарный области IMH; 4) Белок HP (предполагаемая детерминанта связывания). Ранее на примере фага BPP-1 было показано, что связывание РНК-TR-последовательности с ревертазой обеспечивается специальной связывающей детерминантой (avd), белком, бочкообразной структуры. Без нее мутагенный ретрохоминг у фага BPP-1 невозможен. Предположение о том, что HP является детерминантой связывания, мы выдвинули на основании его конформации, которую составляют α-спирали, как и у белка avd. После получения всех необходимых элементов DGR-кассеты, мы провели эксперименты, позволяющие установить функциональные характеристики ревертазы фага LMMB. Для этого провели реакцию обратной транскрипции на четырех различных смесях. Все смеси содержали IMH РНК, РНК-праймер, dNTP и буфер. Полученные в результате ампликоны мы подвергли электрофоретическому анализу. Смеси, содержащие ревертазу, как с HP, так и без показали одинаковый выход кДНК, в то время как смеси без ревертазы показали отрицательный результат. Исходя из полученных данных, мы сделали вывод, что реакция обратной транскрипции идет независимо от наличия в смеси белка HP, что предполагает возможность фага LMMB вести «avd-независимый» ретрохоминг.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-266

РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ В РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВАХ *

THE ROLE OF LIPID METABOLITES IN THE REGULATION OF REGENERATIVE PROCESSES IN DAMAGED SOMATIC NERVES

М. В. Парчайкина, И. Д. Молчанов, Е. В. Чудайкина, Т. П. Кузьменко, Э. С. Ревина, А. В. Заварыкина, М. А. Симакова, В. В. Ревин

Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Саранск

M. V. Parchaykina, I. D. Molchanov, E. V. Chudaikina, T. P. Kuzmenko, E. S. Revina, A. V. Zavarykina, M. A. Simakova, V. V. Revin

Ogarev Mordovia State University, Saransk

✉ zyuzina-tatjana@mail.ru

Аннотация

При действии различных физиологически активных веществ метаболиты липидной природы в поврежденном нерве запускают ключевые сигнальные каскады, отвечающие за регенерацию поврежденных соматических нервов. Активация этих сигнальных путей приводит к регуляции многих биологических процессов, таких как миграция клеток, пролиферация, дифференцировка и апоптоз.

Abstract

Under the action of various physiologically active substances, lipid metabolites in the damaged nerve trigger key signaling cascades that are responsible for the regeneration of damaged somatic nerves. Activation of this pathway leads to the regulation of many biological processes such as cell migration, proliferation, differentiation and apoptosis.

Низкая скорость роста аксонов после травмы и непродолжительная продукция нейротрофических факторов является главной проблемой полного функционального восстановления нерва после повреждения [4].

Метаболиты липидной природы играют важную роль в регуляции сигнальных каскадов для выживания и роста нервных клеток, в связи с чем изучение их роли в регуляции регенерационных процессов представляется весьма перспективным.

Известно, что Ras — это белки, связанные с плазматическими мембранами клеток, работающие по механизму ГТФазного цикла. Активация Ras может осуществляться в сигнальных путях, опосредованных липидными соединениями. Ras выполняет функцию вторичного мессенджера в путях, где компоненты передачи сигнала являются белками.

Активированный ERK1/2 фосфорилирует широкий спектр субстратов и может регулировать транскрипционную активность клеток посредством фосфорилирования ряда мишеней транскрипционных факторов, вызывая регенеративный ответ в периферической нервной системе [1].

Сигнальный каскад JNK/c-Jun играет важную роль в различных нейробиологических процессах, таких как выживаемость нейронов, аксональная пластичность и ремиелинизация.

JNK, или c-Jun N-terminal kinase, активируется в ответ на различные стрессы и факторы роста. Его активация может происходить через множество путей, включая каскад, в котором участвуют белки RAS. RAS может обуславливать активацию MEEKK (Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase), которая инициирует дальнейшую активацию JNK.

Сигнальный путь RhoA/ROCK играет важную роль в регуляции цитоскелетных изменений и регенерации нервных клеток после травмы. В нормальных условиях активация RhoA и его эффектора ROCK (Rho-associated kinase) приводит к ингибированию роста аксонов, а также к увеличению стабильности микрофиламентов и активации клеточных механизмов, препятствующих регенерации. Ингибирование этого сигнального пути, например,

* 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).

© М. В. Парчайкина, И. Д. Молчанов, Е. В. Чудайкина, Т. П. Кузьменко, Э. С. Ревина, А. В. Заварыкина, М. А. Симакова, В. В. Ревин, 2024

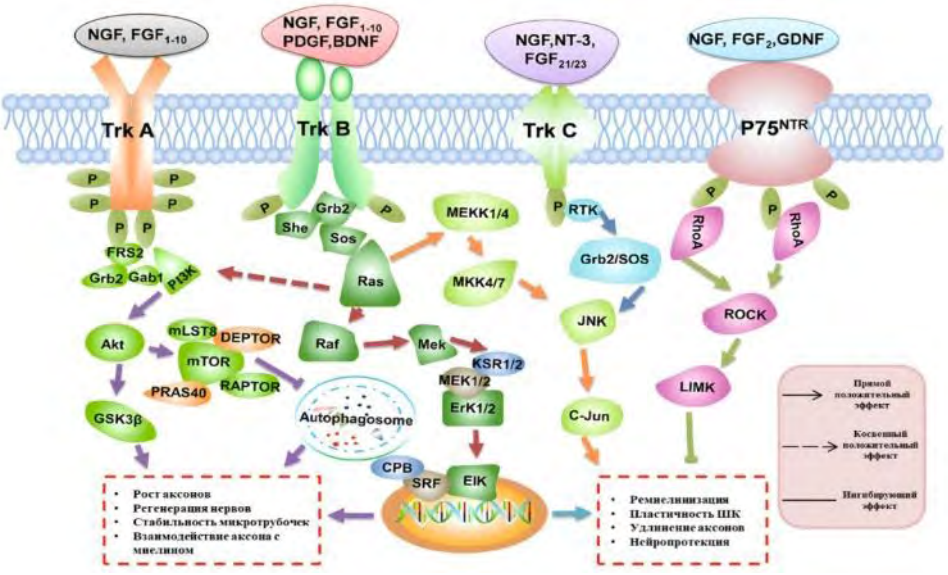
с помощью Y-27362 значительно улучшает отрастание аксонов и восстановление функций после повреждения периферических нервов.

Активация сигнального пути нейрегулина 1 (Nrg1-ErbB) положительно регулирует дифференцировку Шванновских клеток и толщину миелиновой оболочки. Кроме того, после взаимодействия p75 NTR рецептора фактора роста нервов с NGF может напрямую активироваться передача сигналов Nrg1-ErbB, что способствует росту аксонов и ремиелинизации [2].

Сигнальный путь JAK/STAT3 играет важную роль в процессах, связанных с регенерацией нервной системы. Активирование этого пути может способствовать регуляции таких процессов, как клеточная пролиферация, миграция клеток и миелинизация, что имеет решающее значение для восстановления нервной ткани после повреждения. Агонисты JAK, такие как 4-метилгистамин дигидрохлорида (4-MeH), могут усиливать активность сигнального пути JAK/STAT3 и способствовать росту и ремоделированию аксонов.

Фосфоинозитид-3-киназный сигнальный путь (PI3K/Akt) играет важную роль в регуляции экспрессии различных факторов транскрипции через активацию Akt (протеинкиназы B (PKB)). Akt напрямую регулирует выживаемость клеток, подавляя проапоптотические сигналы, такие как факторы транскрипции Bad и FOXO [5].

Сигнальные каскады фосфоинозитид-3-киназы PI3K/Akt/mTOR и PI3K/Akt/GSK3β тесно связаны с формированием конуса роста, нейропластичностью и ростом аксонов в развивающейся и регенерирующей нервной системе (см. рисунок).



Сигнальные каскады, участвующие в регенерации поврежденного нерва [2]

В ходе проведенных нами исследований было показано, что использование физиологически активных соединений, а именно физетина и инсулиноподобного фактора роста 1, оказывает влияние на изменение содержания фракций фосфоинозитидов, диацилглицерина и свободных жирных кислот, а также сопровождается восстановлением способности проводить потенциал действия поврежденными нервными проводниками, что указывает на активизацию процессов регенерации в соматических нервах после травмы.

Таким образом, при действии различных физиологически активных веществ метаболиты липидной природы запускают ключевые сигнальные каскады, которые отвечают за регенерацию поврежденных соматических нервов. Тем не менее эти механизмы остаются неизвестными и дальнейшее их изучение представляет теоретическую и практическую значимость.

Литература

1. Napoli I. L., Noon A., Ribeiro S. et al. A central role for the ERK-signaling pathway in controlling Schwann cell plasticity and peripheral nerve regeneration in vivo // Neuron. 2012. Vol. 73. P. 729–742.

2. Li R., Li D., Zhang H. et al. Growth factors-based therapeutic strategies and their underlying signaling mechanisms for peripheral nerve regeneration // Acta Pharmacol Sin. 2020. Vol. 41. P. 1289–1300.

3. Jessen K. R. Mirsky R., Lloyd A. C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015. Vol. 7, Iss. 7.

4. Karagyaur M. N., Makarevich P. I., Shevchenko E. K. et al. Modern approaches to peripheral nerve regeneration after injury: the prospects of gene and cell therapy // Genes and Cells. 2017. Vol. 12. P. 6–14.

5. Nitulescu G. M., Venter M. V., Nitulescu G. et al. The Akt pathway in oncology therapy and beyond // Int. J. Oncol. 2018. Vol. 53, Iss. 6. P. 2319–2331.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-267

МЕХАНИЗМЫ ЭНДОЦИТОЗА AMPA-РЕЦЕПТОРОВ В ПРОЦЕССАХ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА *

MECHANISMS OF AMPA RECEPTOR ENDOCYTOSIS IN THE PROCESSES OF SYNAPTIC PLASTICITY OF THE HIPPOCAMPUS

А. Л. Проскура[1], С. О. Вечкапова[1,2], Е. Д. Сорокоумов[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр информационных и вычислительных технологий, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный медицинский университет*

A. L. Proskura[1], S. O. Vechkapova[1,2], E. D. Sorokoumov[1]

[1] *Federal Research Center for Information and Computational Technologies, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State Medical University*

✉ svetavech@yandex.ru

Аннотация

Эндоцитоз глутаматных рецепторов AMPA-типа является ключевым событием в регуляции синаптической пластичности в гиппокампе. В работе представлена реконструкция связи синаптических сигнальных путей с молекулярными механизмами эндоцитоза AMPA-рецепторов. Для реконструкции белок-белковых взаимодействий использовалась технология GeneNet (РОСПАТЕНТ № 990006 от 15/02/1999) на основании открытых источников базы PubMed.

Abstract

Endocytosis of AMPA type glutamate receptors is a key event in the regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. The work presents a reconstruction of the connection of synaptic signaling pathways with the molecular mechanisms of AMPA receptor endocytosis. GeneNet technology (ROSPATENT No. 990006 dated 15/02/1999) was used to reconstruct protein-protein interactions based on open sources of the PubMed database.

Ионотропные глутаматные рецепторы NMDAR (N-метил-D-аспартатный рецептор), AMPAR (α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты рецептор) являются ключевыми компонентами возбуждающих синапсов. С помощью структурных белков постсинаптической плотности они образуют различные белковые макрокомплексы. Кроме того, в зоне синаптического контакта присутствуют рецепторы различных гормонов, в частности инсулина, факторов роста и нейротрофических факторов, а также рецепторы других медиаторных систем. Связь синаптических сигнальных путей с молекулярными механизмами эндоцитоза AMPARs остается неясной.

Анализ путей эндоцитоза AMPARs производился на основе сети AMPA receptors delivery mechanisms in LTP базы данных GeneNet [1]. AMPAR подвергается функционально различному конститутивному и регулируемому клатрин-зависимому эндоцитозу, способствуя различным формам синаптической пластичности. При индукции синаптической пластичности интернализованные AMPARs подвергаются эндосомальной сортировке и циклически проходят через ранние эндосомы и рециклируют обратно на плазматическую мембрану (при долговременной потенциации) или деградируют в лизосомах (при долговременной депрессии) [2]. Прием основного медиаторного сигнала — глутамата — осуществляется макрокомплексами NMDAR. Активация NMDAR приводит к клатрин-зависимому эндоцитозу постсинаптических AMPARs. Ключевым событием является появление пула вторичных мессенджеров. P4 → PIP2 (PtdIns(4,5)P2) катализирует фосфоинозитид 5-киназу (PI5K), PIP2 → PIP3 (PtdIns(3,4,5)P3) опосредует фосфоинозитид 3-киназу (PI3K). Приток Ca^{2+} через NMDAR активирует кальциневрин и протеинфосфатазу 1 для дефосфорилирования и активации фосфатидилинозитол 4-фосфат 5-киназы (PIP5K), основного фермента, продуцирующего фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат ($PI(4,5)P_2$) в мозге. PtdIns(4,5)P2 является субстратом для гидролиза фосфолипазой C (PLC). Продуктами катализа PLC PIP2 являются инозитол 1,4,5-трифосфат (InsP3; IP3) и диацилглицерол (DAG), которые выполняют функцию вторичных посредников. DAG остается на клеточной мембране и активирует протеинкиназу C (PKC). GluR2-AMPARs, ко-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ для Федерального исследовательского центра информационных и вычислительных технологий.

© А. Л. Проскура, С. О. Вечкапова, Е. Д. Сорокоумов, 2024

торые обеспечивают основную нейротрансмиссию, перемещаются из зоны синаптических контактов после фосфорилирования PKC по S880 цитоплазматического домена субъединицы GluR2. Метаботропные глутаматные рецепторы I класса, mGluR1 и mGluR5 участвуют в регуляции процессов синаптической пластичности посредством активации PLC [3].

Также был реконструирован альтернативный путь активации PIP5K в интерактоме дендритных шипиков во время синаптической пластичности, опосредованной NMDAR: ARF6 → PI(4)P5K альфа → PI(4,5)P2 (PIP2). PI(4)P5K альфа является нисходящим эффектором ARF6. Активация ARF6 способствует активной перестройке цитоскелета и мембраны. Активаторы ARF6, такие как EFA6A, BRAG, сконцентрированы в постсинаптической плотности и образуют белковый комплекс с NMDAR. BRAG2 регулирует Arf6-зависимый эндоцитоз AMPARs посредством снижения их синаптической экспрессии в нейронах, что происходит во время долговременной депрессии в гиппокампе [4].

На постсинаптической мембране помимо глутаматных рецепторов обнаруживаются рецепторы ряда гормонов, в частности инсулина. Известно, что инсулин регулирует эндоцитоз синаптических AMPARs. Эффекты инсулина опосредованы накоплением PIP3, что обеспечивает пролонгированную активность PKC и способствует эндоцитозу GluR2-AMPAR. Важно подчеркнуть, что для накопления PIP3 необходимо выключить главного антагониста PI3K — PTEN. Активные формы кислорода выключают PTEN, что необходимо для реализации эффекта инсулина.

Таким образом, эндоцитоз AMPAR является ключевым событием в регуляции синаптической пластичности. Существуют различные и/или альтернативные пути запуска эндоцитоза синаптических рецепторов, которые находятся под контролем сложной регуляторной сети в интерактоме дендритных шипиков.

Литература

1. AMPA receptors delivery mechanisms in LTP базы данных GeneNet. URL: http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/genenet/viewer/AMPA.html.

2. Sluijs P. van der, Hoogenraad C. C. New insights in endosomal dynamics and AMPA receptor trafficking // Semin Cell Dev Biol. 2011. Vol. 22 (5). P. 499–505.

3. Neyman S., Manahan-Vaughan D. Metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) and 5 (mGluR5) regulate late phases of LTP and LTD in the hippocampal CA1 region in vitro // Eur. J. Neurosci. 2008. Vol. 27 (6). P. 1345–1352.

4. D'Souza-Schorey C., Li G., Colombo M. I., Stahl P. D. A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis // Science. 1995. Vol. 267 (5201). P. 1175–1178.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-268

ИНТЕРФЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ РАССЕИВАЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ЭНДОНУКЛЕАЗЫ SPYCAS9 С НАПРАВЛЯЮЩЕЙ SGPHK*

INTERFEROMETRIC SCATTERING MICROSCOPY FOR INVESTIGATION SPYCAS9 ENDONUCLEASE AND GUIDE SGRNA COMPLEX

Л. В. Саковина[1,2], А. В. Ендуткин[1], Д. О. Жарков[1,2]

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

L. V. Sakovina[1,2], A. V. Endutkin[1], D. O. Zharkov[1,2]

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

✉ kodi99@list.ru

Аннотация

С помощью интерферометрической рассеивающей микроскопии (ИРМ), основанной на принципах интерференционно-отражательной микроскопии и интерферометрической рассеивающей микроскопии [1], возможно измерение молекулярных масс отдельных молекул. В данной работе была проведена оценка метода ИРМ для исследования биохимических свойств эндонуклеазы SpyCas9 и ее комплекса с направляющей sgRNA.

Abstract

Using interferometric scattering microscopy (ISM), based on the principles of interference-reflection microscopy and interferometric scattering microscopy [1], it is possible to measure the molecular masses of individual molecules. In this study, we evaluated the ISM method to investigate the biochemical properties of the SpyCas9 endonuclease and SpyCas9 and guide sgRNA complex.

Интерферометрическая рассеивающая микроскопия (ИРМ) основана на обнаружении рассеянного света от образца в оптическом микроскопе. При этом имеется корреляция между степенью рассеяния света и размером молекулы, что позволяет измерять массы отдельных молекул в растворе без процедуры мечения или иммобилизации образца. На сегодняшний день ИРМ используется для измерения молекулярных масс белков и нуклеиновых кислот, оценки гомогенности их растворов, изучения гетерогенности и стехиометрии комплексов, а последующая обработка данных позволяет оценить степень сродства молекул в комплексах.

В частности, ИРМ может использоваться в качестве дополнительного аналитического метода для характеристики свойств препаратов белков после очистки. В данной работе для оценки чистоты, однородности препарата SpyCas9 из *Streptococcus pyogenes,* полученного тремя стадиями хроматографической очистки: аффинной с иммобилизованными ионами Ni^{2+}, ионообменной и гель-фильтрацией, был использован метод ИРМ. При низких концентрациях SpyCas9 (5–50 нМ), используемых для ИРМ, определена молекулярная масса Cas9 (155,9 кДа), соответствующая ранее охарактеризованной для SpyCas9 [2]. При определении молекулярной массы sgRNA протяженностью 102 нуклеотида регистрировали образование как мономерной формы (38 кДа), так и димеров (67,05 кДа).

Кроме того, с помощью ИРМ было проведено исследование свойств связывания эндонуклеазы SpyCas9 и направляющей sgRNA. В присутствии sgRNA молекулярная масса смещалась и соответствовала 184,9 кДа, что указывает на формирование комплекса.

Литература

1. Cole D., Young G., Weigel A. et al. Label-Free Single-Molecule Imaging with Numerical-Aperture-Shaped Interferometric Scattering Microscopy // ACS Photonics. 2017. Vol. 4. P. 211–216.

2. Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D. et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA // Cell. 2014. Vol. 156. P. 935–949.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 21-64-00017).

© Л. В. Саковина, А. В. Ендуткин, Д. О. Жарков, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-269

ТЕСТИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В МОДЕЛИ *DANIO RERIO* *

TESTING POTENTIAL COMPONENTS OF GENE THERAPY CONSTRUCTS IN *DANIO RERIO* MODEL

П. И. Селина

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

P. I. Selina

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow

✉ greenapple_35@mail.ru

Аннотация

Поиск эффективных элементов генотерапевтических векторов является важным направлением медико-биологических исследований. В данной работе проведена оценка эффективности функционирования гена протеазы 3C вируса гепатита А человека, промотора гена фактора роста соединительной ткани и промотора гена белка активации фибробластов человека в составе векторов при использовании эмбриональной модели *Danio rerio*.

Abstract

The search for effective elements of gene therapy vectors is an important area of biomedical research. In this work, the efficiency of the functioning of the human hepatitis A virus protease 3C gene, the human connective tissue growth factor gene promoter and the human fibroblast activation protein gene promoter as part of vectors was evaluated using the *Danio rerio* embryonic model.

Одним из ключевых этапов разработки генотерапевтических средств является подбор оптимальных компонентов векторов для обеспечения эффективного действия генетических конструкций. В случае противораковой терапии актуальные направления поиска связаны с генами цитотоксических белков, имеющих каспазо-независимый механизм действия, и промоторных элементов строма-ассоциированных генов, функционирующих в условиях активно изменяющейся структуры тканей.

Цель данной работы заключалась в оценке перспективности использования трех потенциальных векторных компонентов: гена протеазы 3C вируса гепатита А человека (3Cpro), промотора гена фактора роста соединительной ткани (CTGF) и промотора гена белка активации фибробластов (FAP).

Для изучения эффективности функционирования тестируемых генетических элементов на организменном уровне была применена разработанная нами экспериментальная система на основе эмбриональной животной модели Danio rerio (зебрафиш). Методика позволяет проанализировать уровень и динамику накопления целевых белков, идентифицировать типы и количество клеток, в которых происходит экспрессия, охарактеризовать связанные с введением генетических конструкций и экспрессией экзогенных белков в клетках животных токсические эффекты и формирование различных патологий у модельного организма [1, 2]. Для характеристики функционирования промоторных элементов были созданы плазмидные генетические конструкции, в которых находились репортерные гены люциферазы светлячка Photinus pyralis и зеленого флуоресцентного белка EGFP под управлением промотора гена CTGF человека (−365/+43 от сайта начала транскрипции нативного гена) или промотора гена FAP человека (−2026/+118 от сайта начала транскрипции нативного гена). В качестве контролей были использованы плазмиды с конститутивным промотором предранних генов цитомегаловируса человека (CMV) и векторы, не имеющие целевого гена или промотора в составе экспрессионной кассеты. Для оценки токсичности протеазы 3C вируса гепатита А человека был сконструирован вектор с геном 3Cpro под управлением промотора CMV. В качестве контролей были использованы векторы с геном инактивированного варианта фермента с заменой Cys172/Ala в каталитическом центре или с репортерным геном люциферазы светлячка. Генетические конструкции, содержащие анализируемые компоненты, вводили в оплодотворенные яйцеклетки Danio rerio до первого деления стадии дробления в количестве 3–30 амоль/эмбрион.

В результате работы было показано, что промоторы FAP и CTGF обеспечивали сопоставимое накопление маркерных белков с уровнем, обусловленным функционированием контрольного промотора CMV. При этом вы-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

© П. И. Селина, 2024

сокую экспрессионную активность промотора FAP наблюдали только у животных, имеющих скелетно-мышечные патологии, в связи с чем эффективное функционирование данного элемента, по-видимому, связано с нарушением правильной структуры тканей модельного организма. Показано, что экспрессия гена 3Cpro в клетках животных приводила к гибели 70 % особей и образованию аномалий в развитии у жизнеспособных организмов в течение 24 ч после инъекции векторной ДНК.

Таким образом, экспрессия гена 3C протеазы вируса гепатита А человека способна приводить к выраженным токсическим эффектам в организменной системе. Однако необходимы дополнительные исследования для изучения специфичности 3Cpro в отношении непосредственно раковых клеток в животных моделях. Полученные данные указывают на способность промоторов CTGF и FAP человека обеспечивать достаточно эффективную экспрессию целевых генов на организменном уровне, вследствие чего протестированные промоторы могут быть использованы для разработки генотерапевтических векторов. При этом промотор FAP представляется наиболее перспективным для создания генетических конструкций, нацеленных на атипично структурированные ткани, одним из частных случаев которых является опухоль-ассоциированная строма.

Литература

1. Selina P. I., Karaseva M. A., Komissarov A. A. et al. Embryotoxic activity of 3C protease of human hepatitis A virus in developing Danio rerio embryos // Sci. Rep. 2021. Vol. 11, No. 1. P. 18196.

2. Selina P. I., Alekseenko I. V., Kurtova A. I. et al. Efficiency of promoters of human genes FAP and CTGF at organism level in a Danio rerio model // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, No. 8. P. 7192.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-270

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ МИТОХОНДРИЙ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА КРЫС OXYS В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА*

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS OF MITOCHONDRIA IN HIPPOCAMPAL NEURONS OF OXYS RATS DURING EARLY ONTOGENY AND THE INFLUENCE OF EXOGENOUS MELATONIN

Д. В. Ситяева[1], Н. А. Стефанова[2]

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

D. V. Sityaeva[1], N. A. Stefanova[2]

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

✉ d.sityaeva@g.nsu.ru

Аннотация

Дисфункция митохондрий рассматривается как один из ключевых факторов, инициирующих развитие болезни Альцгеймера (БА) — самого распространенного нейродегенеративного заболевания. Работа направлена на оценку особенностей структурно-функционального состояния митохондрий в нейронах гиппокампа крыс OXYS в ранний постнатальный период, их возможного вклада в развитие признаков БА и нейропротекторного потенциала экзогенного мелатонина.

Abstract

Mitochondrial dysfunction is considered one of the key factors initiating the development of Alzheimer's disease (AD), the most common neurodegenerative disorder. This study aims to assess the structural and functional state of mitochondria in hippocampal neurons of OXYS rats during the early postnatal period, their potential contribution to the development of AD symptoms, and the neuroprotective potential of exogenous melatonin.

Исследования последних лет с использованием современных методов диагностики подтвердили, что доклинический период спорадической (> 95 % случаев) формы БА может продолжаться десятилетиями [1, 2], а предпосылки к ее развитию могут формироваться в период эмбрионального развития и при завершении развития мозга в ранний постнатальный период [3, 4]. Причины, молекулярно-генетические предпосылки дисфункции митохондрий у крыс OXYS остаются неясными, но полученные результаты позволили предположить, что с изменениями структурно-функциональных параметров митохондрий в ранний постнатальный период могут быть связаны принципиально важные для развития в дальнейшем признаков БА особенности. На их исследование, а также на оценку эффективности их предупреждения при приеме мелатонина самками-матерями, начиная с подготовки к беременности, ее наступления или с периода лактации, направлена настоящая работа.

Методом электронной микроскопии проведен сравнительный анализ ультраструктуры митохондрий пирамидальных нейронов поля CA1 гиппокампа крыс OXYS и Вистар (контроль) в ранний постнатальный период (возраст 10 дней), а также оценено влияние приема мелатонина самками-матерями на ультраструктурное состояние митохондрий пирамидальных нейронов поля CA1 гиппокампа крыс OXYS в ранний постнатальный период. Работа выполнена на крысятах 5 групп (см. рисунок).

Опытные группы 6 раз в неделю получали с кормом мелатонин (Melaxen, Unifarm, США, растворенный в воде; 0,04 мг/кг массы тела), начиная за две недели до наступления планируемой беременности, во второй группе — начиная с момента ее наступления, в третьей группе — с момента рождения крысят. Крысы-самки OXYS опытных групп (n = 15) получали стандартный рацион + сухарик с добавлением мелатонина; крысы-самки OXYS и Вистар контрольных групп (n = 15) получали стандартный рацион + сухарик.

Для оценки структурно-функциональных параметров митохондрий анализировали по 50–70 пирамидальных нейронов поля CA1 гиппокампа для каждой из 5 исследуемых групп крыс OXYS и Вистар в возрасте 10 дней (n = 3).

На снимках с помощью программы ImageJ проводили оценку площади тел нейронов и их цитоплазмы, ядра, ультраструктуры митохондрий, подсчет количества митохондрий и находящихся среди них в процессе де-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания (проект № FWNR-2022-0016).

© Д. В. Ситяева, Н. А. Стефанова, 2024

ления/слияния, а также митохондрий, контактирующих с ядром или ЭПР. Статистическую обработку проводили в программе STATISTICA 10 с использованием однофакторного дисперсионного анализа и последующими post hoc сравнениями групповых средних (Newman-Keuls test).

В ходе настоящей работы анализ ЭМ-изображений показал, что в возрасте 10 дней между контрольными крысами OXYS и Вистар был выявлен ряд значимых межлинейных различий. Для крыс линии OXYS: площадь тел нейронов и их цитоплазмы была меньше; доля митохондрий, находящихся в процессе деления/слияния (митохондриальная динамика), снижена; доля митохондрий с умеренной и крайне выраженной степенью митохондриальной деструкции вдвое больше; количество контактов митохондрия-ядро повышено.

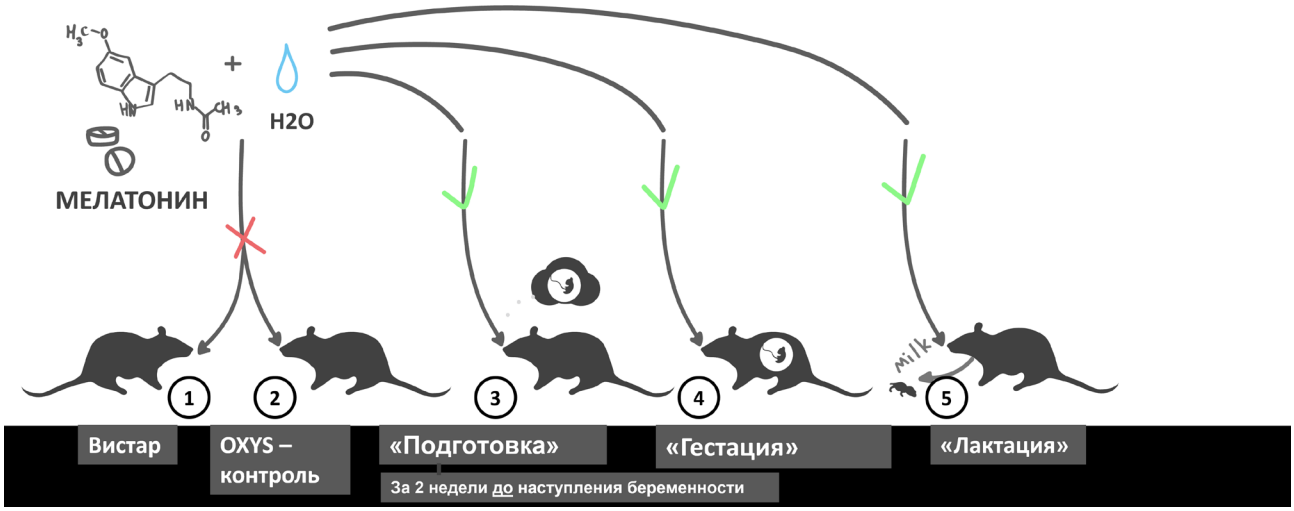


Схема эксперимента. Оценка влияния приема мелатонина самками-матерями на структурные параметры митохондрий в пирамидальных нейронах поля CA1 гиппокампа их потомства — крысят-самцов в возрасте 10 дней. Группы: матери OXYS, которые принимали мелатонин начиная за 2 недели до наступления беременности (*3*), с наступления беременности (*4*), с периода лактации (*5*); *1*, *2* — OXYS/Вистар без приема мелатонина

В то же время прием мелатонина нивелировал эти различия. Для крыс OXYS всех 3 опытных групп: «подготовка», «гестация» и «лактация» площадь тел нейронов, цитоплазмы, ядра была больше в сравнении с OXYS (контроль). Показано, что мелатонин в целом оказал положительный эффект на активацию системы контроля качества митохондрий, направленную на сохранение здоровых и удаление поврежденных митохондрий, за счет снижения доли митохондрий с выраженной и умеренно выраженной степенью деструкции, активировал митохондриальную динамику (процесс деления/слияния), снизил удельное содержание митохондрий, контактирующих с ядром.

Таким образом, получены данные, свидетельствующие о задержке созревания пирамидальных нейронов поля CA1 гиппокампа крыс OXYS в ранний постнатальный период (возраст 10 дней). Показана эффективность приема экзогенного мелатонина как мощного нейропротектора и антиоксиданта, способного предотвращать задержку созревания мозга в раннем возрасте за счет повышения эффективности прохождения нейрогенеза, активации системы контроля качества митохондрий.

Литература

1. López-Sanz D., Serrano N., Maestú F. The role of magnetoencephalography in the early stages of Alzheimer's disease // Front. Neurosci. 2018. Vol. 12. P. 572.

2. Sepulcre J., Masdeu J. C. Advanced neuroimaging methods towards characterization of early stages of Alzheimer's disease // Methods Mol. Biol. 2015. Vol. 1303. P. 509–519.

3. Gauvrit T., Benderradji H., Buée L. et al. Early-Life Environment Influence on Late-Onset Alzheimer's Disease // Front. Cell Dev. Biol. 2022. Vol. 10. P. 834661.

4. Heinonen S., Buzkova J., Muniandy M. et al. Impaired mitochondrial biogenesis in adipose tissue in acquired obesity // Diabetes. 2015. Vol. 64 (9). P. 3135–3145.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-271

НЕОБЫЧНЫЙ ФЕРМЕНТ КЛАНА CYP74 ЛАНЦЕТНИКА ЕВРОПЕЙСКОГО *

THE UNUSUAL ENZYME OF THE CYP74 CLAN OF EUROPEAN LANCELET

Е. О. Смирнова[1], А. С. Окатова[2], Н. В. Ланцова[1], А. М. Егорова[1], Я. Ю. Топоркова[1], А. Н. Гречкин[1]

[1]Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН
[2]Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета

E. O. Smirnova[1], A. S. Okatova[2], N. V. Lantsova[1], A. M. Egorova[1], Y. Y. Toporkova[1], A. N. Grechkin[1]

[1]Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center RAS
[2]Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

✉ yelenasmirnova1905@yandex.ru

Аннотация

Работа посвящена клонированию обнаруженного нами гена фермента клана CYP74 ланцетника европейского (*Branchiostoma lanceolatum*) и биохимической характеристике соответствующего рекомбинантного белка.

Abstract

The present work reports the detection and cloning of a new CYP74 clan gene of the European lancelet (*Branchiostoma lanceolatum*) and the biochemical characterization of the corresponding recombinant enzyme.

Оксилипины являются важными липидными медиаторами, которые образуются из полиненасыщенных жирных кислот, таких как арахидоновая, линолевая, α-линоленовая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая и др. В биосинтезе оксилипинов принимают участие следующие группы ферментов: циклооксигеназы, липоксигеназы и цитохромы Р450. Кроме того, оксилипины могут образовываться спонтанно без участия ферментов. Подобные оксилипины носят название фитопростаны и изопростаны.

Оксилипины животных включают эйкозаноиды (производные С20 жирных кислот) и октадеканоиды (производные С18 жирных кислот). У животных эйкозаноиды изучены очень хорошо. Они принимают участие в регуляции основных физиологических функций: работы органов пищеварения, сердечно-сосудистой и респираторной систем, воспроизводства, в воспалительных процессах, анафилаксии, системах иммунного ответа и др. В то же время механизмы образования, а также свойства октадеканоидов животных остаются практически неизученными, несмотря на то что содержание С18 жирных кислот в животных тканях достигает значительного количества. При этом оксилипины октадеканового ряда, образуемые в рамках липоксигеназного каскада, хорошо изучены у растений. Показано, что они являются продуктами каталитического действия липоксигеназ и цитохромов Р450 семейства CYP74, к которым относятся алленоксидсинтазы (АОС), дивинилэфирсинтазы (ДЭС), гидропероксидлиазы (ГПЛ).

Цитохромы Р450 семейства CYP74 ранее считались исключительно растительным эволюционным приобретением. Однако в 2008 г. в геномах различных морских беспозвоночных было обнаружено большое количество генов, кодирующих CYP74-подобные ферменты. Тогда же было введено и понятие клана CYP74. К нему отнесли еще одну группу ферментов — эпоксиалкогольсинтазы (ЭАС). Первой охарактеризованной ЭАС был фермент ланцетника *Branchiostoma floridae* [1]. В дальнейшем ЭАС были обнаружены у актинии *Nematostella vectensis,* бурой водоросли *Ectocarpus siliculosus* и представителя царства растений — плаунка *Selaginella moellendorffii*. Важно отметить, что дополнительная ЭАС-активность была обнаружена у ГПЛ подсемейства CYP74C и некоторых ферментов из подсемейства CYP74B.

Ланцетники на данный момент являются единственными хордовыми, у которых описаны гены ферментов клана CYP74. Геномы ланцетников *Branchiostoma floridae* и *B. belcheri* содержат 20 и 10 генов соответственно. Часть генов была клонирована, а соответствующие ферменты охарактеризованы. Так, у *B. floridae* было обнаружено как минимум две ЭАС [1], а у ланцетника *B. belcheri* был обнаружен фермент, который проявлял активность АОС и ЭАС [2]. Следует отметить, что продукты ЭАС-реакции представителей разных таксонов

* Исследование каталитической активности фермента CYP440A19 выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-14-00350).

© Е. О. Смирнова, А. С. Окатова, Н. В. Ланцова, А. М. Егорова, Я. Ю. Топоркова, А. Н. Гречкин, 2024

различаются по стереохимии. ЭАС животных продуцируют эпоксиспирты с цис-дизамещенным эпоксидом, а эпоксиспирты, синтезированные при участии растительных ЭАС, содержат транс-дизамещенное эпоксидное кольцо. По-видимому, образование эпоксиспиртов с цис-конфигурацией эпоксидного кольца является особенностью ЭАС животных.

Геном ланцетника европейского (*B. lanceolatum*) также содержит гены ферментов CYP74. Нами были получены транскриптомные данные этого организма в условиях осмотического стресса и проанализирован профиль оксилипинов. На основании этих данных, а также данных анализа каталитически важных доменов был выбран ген для клонирования (Bl10054) и получен соответствующий рекомбинантный фермент (CYP440A19). При участии данного фермента из С18 гидроперекисей жирных кислот образовывались дивиниловые эфиры (8-цис-колнелевая и этеролевая кислоты — ДЭС продукты), эпоксиспирты (ЭАС продукты), лейкотриен-подобные соединения (подобные соединения образуются из арахидоновой кислоты при участии липоксигеназ) и макролактон [3]. Последние соединения не являются типичными продуктами реакций, катализируемых ферментами CYP74. Результаты данного исследования вносят существенный вклад в понимание метаболизма С18 жирных кислот у животных.

Литература

1. Lee D. S. et al. Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes // Nature. 2008. Vol. 455. P. 363–368.

2. Toporkova Y. Y. et al. Detection of the First Epoxyalcohol Synthase/Allene Oxide Synthase (CYP74 Clan) in the Lancelet (*Branchiostoma belcheri*, Chordata) // Intern. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. P. 4737

3. Smirnova E. O. et al. The versatile CYP74 clan enzyme CYP440A19 from the European lancelet *Branchiostoma lanceolatum* biosynthesizes novel macrolactone, epoxydiene, and related oxylipins // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2024. Vol. 1869. P. 159507.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-272

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА ИЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С МАЛЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ РНК*

STUDY OF THE INTERACTION OF COLD SHOCK PROTEINS FROM *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* WITH SRNAS

Н. А. Смольянова, Н. В. Леконцева, А. Д. Никулин

Институт белка РАН, Пущино

N. A. Smolianova, N. V. Lekontceva, A. D. Nikulin

Institute of Protein Research RAS, Pushchino

✉ smolyanova_natulya@mail.ru

Аннотация

Туберкулез представляет собой распространенную инфекцию, поражающую как людей, так и животных. Заболевание вызывается различными штаммами *Mycobacterium tuberculosis*, которая ежегодно становится причиной гибели около двух миллионов человек по всему миру. Проникая в организм хозяина, микобактерии подавляют аутофагию и межклеточную сигнализацию, они также устойчивы к токсичным веществам, что обеспечивает их выживание внутри макрофагов. *M. tuberculosis* демонстрирует высокую степень генетического разнообразия, что способствует их устойчивости к лекарственным средствам. Появление мультирезистентных штаммов (МРТБ) является серьезной проблемой для здравоохранения, усложняя диагностику и лечение заболевания. Лекарственные препараты, используемые для борьбы с туберкулезом, часто требуют длительной терапевтической схемы лечения, что увеличивает риск побочных эффектов.

Понимание механизмов, благодаря которым микобактерии уклоняются от иммунного ответа, открывает новые горизонты для разработки вакцин и более эффективных терапевтических подходов. Так, одной из стратегий выживания данного патогена является наличие множества малых регуляторных РНК (мрРНК), которые образуют сложные регуляторные сети с мРНК, что помогает бактерии быстро и эффективно адаптировать свой метаболизм на различных стадиях инфекции. Обычно процесс регуляции трансляции, в котором участвуют малые регуляторные РНК, активно поддерживается РНК-шаперонами — белками, способствующими расплетанию вторичной структуры РНК и взаимодействию разных молекул РНК, таких как мрРНК и мРНК. Поскольку известные и наиболее изученные РНК-шапероны Hfq и ProQ не были найдены в микобактериях, то существует предположение, что эту роль могут выполнять другие РНК-связывающие белки, например представители семейства белков CspA/CspB.

Abstract

Tuberculosis is a common infection affecting both humans and animals. The disease is caused by various strains of Mycobacterium tuberculosis, which causes about two million deaths worldwide each year. Once infiltrated into the host, mycobacteria inhibit autophagy and intercellular signaling, they are also resistant to toxic substances, which ensures their survival within macrophages. M. tuberculosis exhibits a high degree of genetic diversity, which contributes to their resistance to drugs. The emergence of multidrug-resistant strains (MDRTB) is a serious public health problem, complicating the diagnosis and treatment of the disease. Drugs used to control TB often require a long therapeutic regimen, increasing the risk of side effects.

Understanding the mechanisms by which mycobacteria evade the immune response opens new horizons for the development of vaccines and more effective therapeutic approaches. For example, one of the survival strategies of this pathogen is the presence of multiple small regulatory RNAs (mRNAs) that form complex regulatory networks with mRNAs, helping the bacterium to rapidly and efficiently adapt its metabolism at different stages of infection. Normally, the process of translation regulation involving small regulatory RNAs is actively supported by RNA chaperones, proteins that promote the unraveling of the RNA secondary structure and the interaction of different RNA molecules such as mRNA and mRNA. Since the known and most studied RNA chaperones Hfq and ProQ were not found in mycobacteria, there is an assumption that this role may be performed by other RNA-binding proteins, such as members of the CspA/CspB protein family.

CspA и CspB из *M. tuberculosis* относятся к высококонсервативному семейству белков холодового шока и структурно представляют собой β-бочонок из пяти антипараллельных β-тяжей. Известно, что белки этого семейства продуцируются в бактериях в ответ на холодовой стресс и могут влиять на образование вторичных структур РНК при низких температурах. Mtb CspA и Mtb CspB не были подробно исследованы и схожесть их функций с гомологами из других бактерий остается под вопросом.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-24-00071).

© А. Д. Никулин, Н. В. Леконцева, Н. А. Смольянова, 2024

В результате наших исследований были созданы генетические конструкции, которые кодируют белки CspA и CspB из *M. tuberculosis*, а также гены нескольких малых регуляторных РНК микобактерии. Мы разработали методику получения данных белков и добились получения первых кристаллов препарата MtbCspA. Для исследований мы выбрали три мрРНК, представляющие наибольший интерес с точки зрения приспособляемости и развития патогенности — мрРНК **MCR11 (MTS 997); DRRS (MTS 1338); ncRv3648c**. Малые регуляторные РНК были синтезированы *in vitro*. Взаимодействие белков с малыми регуляторными РНК было изучено с помощью электрофоретического анализа связывания (EMSA) и аналитической эксклюзионной хроматографии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-273

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ НОВОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК CHOL, АССОЦИИРОВАННОЙ С ХОЛАНГИОКАРЦИНОМОЙ

IDENTIFICATION AND COMPARATIVE ANALYSIS OF DIFFERENT ISOFORMS OF A NOVEL NON-CODING RNA CHOL ASSOCIATED WITH CHOLANGIOCARCINOMA

А. Д. Смыслов[1], Р. К. Макарченко[2], В. А. Родин[2], Н. Л. Лазаревич[2,3], М. Э. Зверева[2], М. П. Рубцова[2], О. А. Донцова[1,2], О. Ю. Буренина[1,2]

[1]*Сколковский институт науки и технологий, Москва*
[2]*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[3]*Институт канцерогенеза, Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина, Москва*

A. D. Smyslov[1], R. K. Makarchenko[2], V. A. Rodin[2], N. L. Lazarevich[2,3], M. E. Zvereva[2], M. P. Rubtsova[2], O. A. Dontsova[1,2], O. Yu. Burenina[1,2]

[1]*Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*
[2]*Lomonosov Moscow State University*
[3]*Institute of Carcinogenesis, N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow*

✉ akim.infinity@gmail.com

Аннотация

CHOL — недавно обнаруженная нами некодирующая РНК, активно экспрессирующийся в холангиокарциноме и неоднозначно аннотированная в геноме человека. В ходе экспериментального исследования мы обнаружили целый спектр транскриптов — продуктов альтернативного сплайсинга, содержащих разнообразные варианты первого экзона. Мы предполагаем, что по крайней мере часть изоформ ассоциированы с прогрессирующей стадией рака печени.

Abstract

CHOL is a recently discovered non-coding RNA that is highly expressed in cholangiocarcinoma and is ambiguously annotated in the human genome. During the experimental study, we discovered a whole range of transcripts — products of alternative splicing, containing numerous variants of the first exon. We suggest that at least some isoforms are associated with advanced liver cancer.

Холангиокарцинома (ХЦР) — второй по распространенности тип рака печени, протекающий бессимптомно на ранних стадиях заболевания. На сегодняшний день не существует диагностических биомаркеров, специфических для ХЦР и/или дифференцирующих ХЦР от гепатоцеллюлярной карциномы в случае неоднозначной гистологии опухоли. Одним из перспективных направлений является поиск некодирующих РНК (нкРНК), ассоциированных с определенным типом опухолей, так как их можно выделять непосредственно из биологических жидкостей или биоптата и оценивать уровень экспрессии с помощью ОТ-кПЦР.

Недавно в нашей научной группе была идентифицирована нкРНК CHOL, активно экспрессирующаяся при ХЦР. Для гена *CHOL* был аннотирован 1 транскрипт длиной 235 н. о. из 3 экзонов, что мы подтвердили экспериментально как на раковых клеточных линиях гепатоцитов (HepG2, Huh7), так и на образцах рака печени. Сравнительный количественный анализ экспрессии экзонов выявил несоответствия, что говорило о наличии нескольких изоформ CHOL разного состава. Кроме того, в обновленной версии ENCODE реаннотация транскриптов привела к объединению гена *CHOL* и 18 транскриптов соседнего гена, причем часть транскриптов имела экстремально протяженные интроны (20–30000 н. о.) и общая длина гена составляла 70 000 п. н.

Таким образом, целью данного исследования стало установление конкретных транскриптов CHOL РНК. В качестве модельного объекта выбрали клеточную линию HepG2 с максимальной экспрессией CHOL. Для определения экзонного состава транскриптов использовали метод быстрой амплификации концов кДНК (RACE), проходивший в три раунда со «сходящимися» праймерами, комплементарным экзонам CHOL и вариантам предполагаемых транскриптов. На первом этапе удалось установить точные 5′- и 3′-концы только у нескольких основных транскриптов. Последовательность первого экзона отличалась от ожидаемой и была длиннее, а при секве-

© А. Д. Смыслов, Р. К. Макарченко, В. А. Родин, Н. Л. Лазаревич, М. Э. Зверева, М. П. Рубцова, О. А. Донцова, О. Ю. Буренина, 2024

нировании выделенных ДНК-фрагментов по Сэнгеру наблюдали смешанный сигнал. В связи с этим была применена технология нанопорового секвенирования (MinION). В результате удалось установить, что все изоформы CHOL РНК содержат экзоны 2 и 3, тогда как для первого экзона существует 2 альтернативных варианта (1a и 1b). При этом каждый из «первых» экзонов в результате неточного сплайсинга существовал в виде несколько вариантов, различающихся на 10–20 н. о. с 3′-конца, что и обуславливало невозможность их точной идентификации «классическим» способом.

Все установленные изоформы не содержали с 5′-конца экзонов, общих с основными 14 транскриптами соседнего гена, однако с 3′-конца были идентифицированы 3 экзона (9, 10, 9.5), общие с 4 другими транскриптами этого гена. Итого общая длина основных транскриптов CHOL составляла от 800 до 1200 н. о., и только несколько минорных транскриптов имели длину 230–250 н. о. При этом все варианты содержали в себе универсальный участок (экзоны 2+3). Отметим, что экзоны 1b и 9.5 не были аннотированы ранее. На основе полученных данных был сделан вывод, что ген CHOL неверно аннотирован в базах данных, то есть среди заявленных 19 транскриптов 5 относятся к самой CHOL, а 14 других — к соседнему гену.

Известно, что у HepG2 трисомия второй хромосомы, содержащей ген CHOL. Чтобы исключить вероятность гетерогенности транскриптов в результате специфических мутаций HepG2, эксперименты повторили на образцах печени пациентов. Данные подтвердили результаты для HepG2 — мы по-прежнему наблюдали экспрессию всего спектра транскриптов CHOL со всевозможными вариантами экзона 1. В образцах здоровой печени были детектированы в основном длинные изоформы CHOL (800–1200 н. о.). Короткие изоформы (230–250 н. о.), преимущественно содержащие экзон 1b, были наиболее представлены в образцах ХЦР (IV стадия), более того, нам удалось идентифицировать несколько дополнительных вариантов этого экзона.

Исходя из полученных результатов, мы предполагаем, что при ХЦР происходит не только активация транскрипции основных изоформ CHOL, но и «включение» дополнительного промотора, дающего начало транскриптам с экзоном 1b. Наблюдается крайней неточный сплайсинг прекурсора CHOL, что приводит к существованию спектра транскриптов с разницей 20–100 н. о. При этом функциональную роль играют только «универсальные» экзоны 2 и 3, а вариабельные 3′- и 5′-«плечи» нужны для поддержания структуры и стабильности РНК. Данная гипотеза требует дальнейшего экспериментального подтверждения, однако с точки зрения потенциальной диагностики мы предполагаем, что активация транскрипции коротких изоформ CHOL 1b-2-3 может иметь место на последних стадиях канцерогенеза при ХЦР.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-274

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ (2'-ДЕЗОКСИ)АДЕНОЗИНЫ И ФЕНОКСАЗИНЫ КАК ИНДУКТОРЫ АУТОФАГИИ *

MODIFIED (2'-DEOXY)ADENOSINES AND PHENOXAZINE AS AUTOPHAGY INDUCERS

С. Я. Сокольская[1], Б. П. Мясников[2], Е. А. Гусева[1,3,4], П. Н. Камзеева[5], П. В. Сергиев[1,3,4], А. В. Аралов[5,6]

[1] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*
[2] *Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова, Москва*
[3] *Сколковский институт науки и технологий, Москва*
[4] *НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, Москва*
[5] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*
[6] *Российский университет дружбы народов, Москва*

S. Y. Sokolskaya[1], B. P. Myasnikov[2], E. A. Guseva[1,3,4], P. N. Kamzeeva[5], P. V. Sergiev[1,3,4], A. V. Aralov[5,6]

[1] *Lomonosov Moscow State University*
[2] *Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, Moscow*
[3] *Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow*
[4] *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow*
[5] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*
[6] *Peoples' Friendship University of Russia, Moscow*

✉ sofya.sokolskaya@yandex.ru

Аннотация

Активаторы аутофагии рассматриваются как перспективные молекулы для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Мы обнаружили шесть новых активаторов аутофагии среди двух классов молекул: производных (2'-дезокси)аденозина и аналогов феноксазина. Эти соединения активируют аутофагию по AMPK-зависимому пути и превосходят по активности известный модулятор аутофагии — AICAr.

Abstract

Autophagy inducers are regarded as a promising class of molecules with potential for use in the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. A total of six novel autophagy activators have been identified, belonging to two distinct chemical classes: 2'-deoxyadenosine derivatives and phenoxazine analogues. These compounds activate autophagy by the AMPK-dependent pathway, and exhibit greater activity than the known autophagy modulator AICAr.

Аутофагия — один из фундаментальных молекулярных процессов, служащих для удаления поврежденных компонентов клетки. В естественных условиях основными стимулами для активации аутофагии служат энергетическое и аминокислотное голодание, запускающие разветвленный каскад регуляции аутофагии, ключевым участником которого является AMP-зависимая протеинкиназа (AMPK).

Нарушение этого процесса приводит к нейродегенеративным заболеваниям [1] и ожирению [2]. Активация аутофагии с помощью фармакологических препаратов способствует улучшению состояния при инфаркте миокарда, различных видах кардиомиопатии и атеросклерозе [3]. Известным активатором аутофагии по AMPK-зависимому пути является AICAr, однако он вызывает множество побочных эффектов [4].

Основная цель нашей работы — поиск новых активаторов аутофагии среди синтезированных химических аналогов AICAr и исследование механизма их действия. В данном исследовании мы рассмотрели производные (2'-дезокси)аденозина и феноксазиноподобных структур.

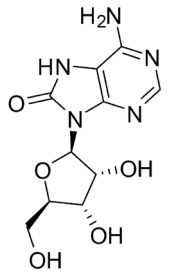
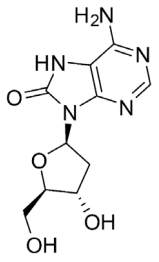
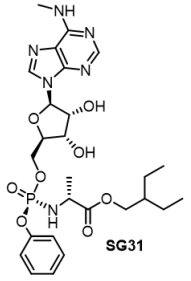
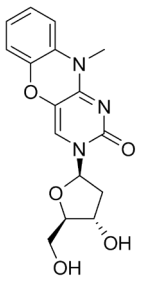
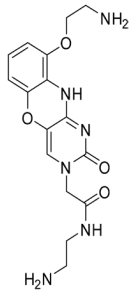
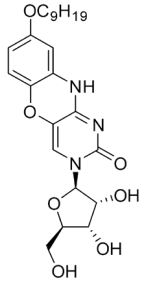
Для оценки способности исследуемых соединений активировать аутофагию мы использовали флуоресцентный клеточный репортерный анализ. В данной репортерной системе RFP (red fluorescent protein) диффузно распределен по клеточной цитоплазме, и аутофагия значимо не влияет на уровень его флуоресценции. GFP (green fluorescent protein) вместе с LC3 включается в аутофагосомы при активации аутофагии. При слиянии аутофаго-

* Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2024-539).

© С. Я. Сокольская, Б. П. Мясников, Е. А. Гусева, П. Н. Камзеева, П. В. Сергиев, А. В. Аралов, 2024

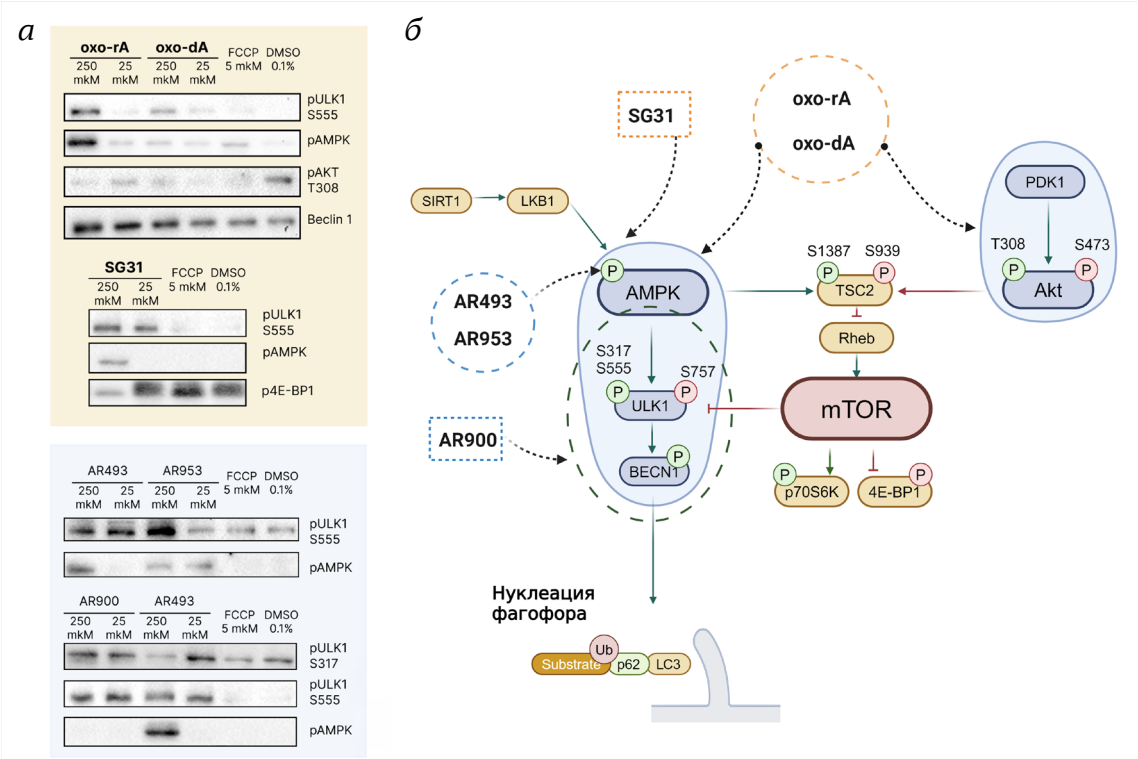
сомы и лизосомы снижается pH внутри везикулы, что приводит к уменьшению флуоресцентного сигнала GFP в клетке. Таким образом, сравнивая отношение красного и зеленого сигналов в клетках в различных условиях, можно сделать вывод об уровне активности аутофагии. Для соединений, обладающих наибольшей активностью, полученные результаты были подтверждены с помощью иммуноблоттинга на маркер аутофагии — белок LC3. Из каждой группы веществ были выбраны лучшие активаторы аутофагии (см. таблицу).

Структуры лидерных соединений

Производные (2'-дезокси)аденозинов			Аналоги феноксазина		
oxo-rA	**oxo-dA**	**SG31**	**AR493**	**AR953**	**AR900**
					

Для определения механизма действия лидерных соединений мы проанализировали статус фосфорилирования основных участников каскада активации аутофагии. Мы показали, что соединения из обоих классов преимущественно активируют AMPK/ULK1-зависимый путь, так как их действие способствовало накоплению фосфорилированных форм (S555 и S317) основного субстрата AMPK — ULK1 (см. рисунок). При этом все соединения, кроме AR900, также вызывали значительное увеличение уровня фосфорилирования AMPK.

Помимо этого, производные (2'-дезокси)аденозина (oxo-dA и oxo-rA) вызывали снижение активирующего фосфорилирования AKT (T308), а обработка клеток SG31 привела к снижению фосфорилирования ULK (Ser 757) и 4E-BP1, что косвенно свидетельствует об ингибировании mTOR — центрального регулятора аутофагии.



Изучение механизма действия лидерных соединений: *а* — изучение статуса фосфорилирования основных участников каскада активации аутофагии; *б* — схема предполагаемого механизма действия лидерных соединений

Для проверки специфичности действия молекул на AMPK-зависимый путь мы использовали клеточные линии, нокаутные по гену *AMPK* и его вышестоящего регулятора *SIRT1*. Инактивация данных генов значительно повлияла на активность AR493 и AR953, что подтверждает гипотезу о том, что основной механизм активации аутофагии для этих молекул — это AMPK-зависимый путь.

Таким образом, в ходе исследования мы обнаружили шесть новых активаторов аутофагии, действующих по AMPK-зависимому пути и превосходящих активность ранее описанного соединения AICAr более чем в 2 раза [5]. При этом два из выявленных активаторов аутофагии обладают значительной специфичностью действия по отношению к AMPK-зависимому пути.

Литература

1. Mello de N. P., Orellana A. M., Mazucanti C. H. et al. Insulin and Autophagy in Neurodegeneration // Front. Neurosci. 2019. Vol. 13. P. 491.

2. Maiuolo J., Gliozzi M., Musolino V. et al. From Metabolic Syndrome to Neurological Diseases: Role of Autophagy // Front Cell Dev Biol. 2021. Vol. 9. P. 651021.

3. Bravo-San Pedro J. M., Kroemer G., Galluzzi L. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease // Circ Res. 2017. Vol. 120 (11). P. 1812–1824.

4. Višnjić D., Lalić H., Dembitz B., Smoljo T. AICAr, a Widely Used AMPK Activator with Important AMPK-Independent Effects: A Systematic Review // Cells. 2021. Vol. 10 (5). P. 1095.

5. Scudiero O., Nigro E., Monaco M. L. et al. New synthetic AICAR derivatives with enhanced AMPK and ACC activation // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2016. Vol. 31 (5). P. 748–753.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-275

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА *PROD* НА СТРУКТУРУ ГЕТЕРОХРОМАТИНА ПРИ ЭФФЕКТЕ ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*[*]

PROD GENE MUTATION INFLUENCES HETEROCHROMATIN STRUCTURE AT POSITION EFFECT VARIEGATION (PEV) IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

А. А. Солодовников, Е. А. Шестакова, С. А. Лавров, В. А. Гвоздев

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

A. A. Solodovnikov, E. A. Shestakova, S. A. Lavrov, V. A. Gvozdev

National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow

✉ gorbins@gmail.com

Аннотация

В работе проведены исследования влияния мутации по гену *Prod*, кодирующему связывающийся с сателлитной ДНК (Prodsat) белок, на архитектуру ядра при гетерохроматиновом эффекте положения. Локализация сателлитной ДНК в ядре на фоне мутации по *Prod* исследована при помощи иммуноокрашивания на гетерохроматиновый белок HP1a в комбинации с гибридизацией *in situ* на сателлит Prodsat. Количественный анализ конфокальных 3D-изображений показал, что мутация по Prod приводит к нарушениям конъюгации гетерохроматиновых последовательностей и изменениям организации ядра.

Abstract

In this study, we investigated the effect of mutation in the Prod gene, which encodes a satellite DNA (Prodsat) binding protein, on the architecture of the nucleus in the flies bearing PEV-inducing rearrangement. Localization of satellite DNA in the nucleus in the Prod mutation background was investigated by immunostaining for the heterochromatin protein HP1a in combination with hybridization *in situ* to the Prodsat satellite. Quantitative analysis of confocal 3D-images showed that Prod mutation leads to impaired conjugation of heterochromatin sequences and changes in nuclear architecture.

Эффект положения гена (ЭПГ) состоит в его инактивации при перемещении в зону гетерохроматина. Цис-действующий ЭПГ наблюдается при хромосомных перестройках, переносящих ген к гетерохроматину, и обусловлен распространением специфической гетерохроматиновой организации на соседние эухроматиновые районы. В редких случаях наблюдается транс-действующий ЭПГ, при котором инактивируются гены нормальной хромосомы в гетерозиготе с перестройкой. Механизмы транс-действующего ЭПГ неясны, но, видимо, связаны с конъюгацией гомологов и перемещением эухроматиновых районов в гетерохроматиновый компартмент ядра. Таким образом, молекулярные механизмы транс-инактивации отличаются от цис-инактивации и должны иметь специфические регуляторы.

В связи с этим, особый интерес представляет негистоновый белок Prod с молекулярной массой около 30 кДа, который объединяет сателлит-содержащие гетерохроматиновые районы 2-й и 3-й хромосом *Drosophila melanogaster* в компактные структуры, называемые хромоцентрами, и играет важную роль в формировании компактной структуры хромосом в процессе митоза. Большие количества белка Prod идентифицированы в районе прицентромерного хроматина 2-й и 3-й хромосом *Drosophila melanogaster* и в более чем 400 эухроматиновых зонах политенных хромосом [1–3]. Мутации в гене *prod,* кодирующем этот белок, вызывают диссоциацию хромоцентров и могут оказывать влияние на эффект положения гена.

Белок Prod связывается с одним из типов сателлитной ДНК (Prodsat). Хромосомная перестройка *In(2)A4* приводит к формированию границ эухроматина с сателлитом Prodsat и способна вызывать транс-действующий эффект положения. Можно предположить, что мутации по *prod*, в норме не являющемуся модификатором эффекта положения, будут специфически влиять на вызываемый *In(2)A4* транс-действующий ЭПГ, нарушая ассоциацию эухроматиновых районов с гетерохроматиновым компартментом.

Для исследований влияния Prod на транс-инактивацию, вызываемую *In(2)A4*, были сконструированы линии мух, содержащих инверсию *In(2)A4* и мутацию $prod^{k088\ 10}$ на хромосоме 2, а также все варианты контролей (только $prod^{k088\ 10}$, только *In(2)A4* и мухи дикого типа). Мутация $prod^{k088\ 10}$ летальна на стадии личинок первого

[*] Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 19-74-20178-П) и в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

© А. А. Солодовников, Е. А. Шестакова, С. А. Лавров, В. А. Гвоздев, 2024

возраста, поэтому исследования проводили на таких личинках. Отбор гомозиготных личинок первого возраста проводили с использованием балансерной хромосомы *CyO-GFP*, далее осуществлялась комбинация иммуноокрашивания на гетерохроматиновый белок HP1a и гибридизации *in situ* с зондом к сателлитной ДНК Prodsat. 3D-изображения органов личинок получали при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM900 и обрабатывали в программе Imaris. Анализировали число и интенсивность зон гибридизации с Prodsat и конфигурацию зоны обогащения по HP1a (гетерохроматиновый компартмент ядра). Схема хромосом и результаты гибридизации показаны на рисунке.

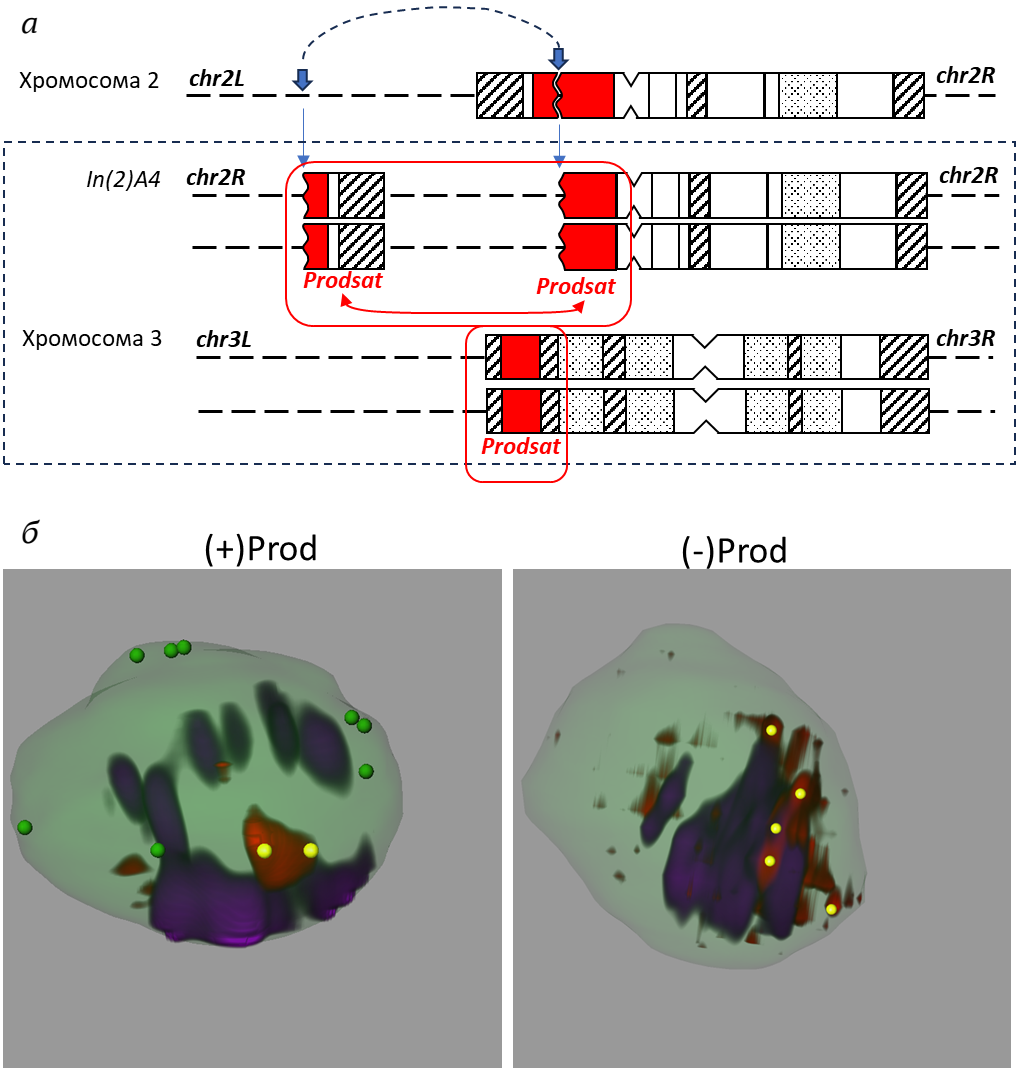


Схема возникновения инверсии *In(2)A4* и структура прицентромерного гетерохроматина хромосом 2 и 3 (*а*). Красным выделены блоки сателлита Prodsat, разрыв инверсии *In(2)A4* произошел в блоке Prodsat в хромосоме 2 и привел к его разделению в соотношении ~ 1 : 3. Отделенные блоки сателлита в норме сближены в пространстве ядра (*красная двусторонняя стрелка*); *б* — примеры ядер из мух дикого типа ((+)Prod) и из мутантов по Prod ((-)Prod). 3D-реконструкция в Imaris, *светло-зеленая оболочка* — ядро, *красное* — гибридизация на Prodsat, *фиолетовое* — окрашивание на HP1a. Шарики показывают результат сегментации изображения в Imaris (точки с максимальной локальной интенсивностью окрашивания на Prodsat). Диаметр шарика 1 мкм. Ряд таких точек (*зеленое*) являются фоновым шумом, желтые соответствуют сигналу от Prodsat

Обнаружено, что в ядрах (+)Prod обычно наблюдается 2–4 сигнала от Prodsat, соответствующих основным блокам сателлита в гетерохроматине хромосом 2 и 3 (в *In(2)A4* малый и большой фрагменты разорванного блока сателлита конъюгируют, давая один сигнал). В ядрах (-)Prod наблюдается в среднем большее число сигналов Prodsat с большим разбросом по интенсивности, что указывает на нарушения конъюгации блоков гетерохроматина, в том числе нарушение взаимодействия малого и большого фрагментов сателлита в *In(2)A4*, что, в свою очередь, указывает на возможную роль Prod в транс-инактивации. Полученные данные воспроизводят результаты [2]

на другой генетической системе и другой стадии развития, подтверждая пригодность системы для дальнейших исследований влияния Prod на транс-инактивацию.

Результаты, полученные в ходе выполнения проекта, позволят исследовать процессы организации ядерных компартментов и влияние изменений ядерной организации на структуру хроматина и процессы эпигенетической регуляции генов не только у дрозофилы, но и в эукариотических организмах в целом.

Литература

1. Torok T., Harvie P. D., Buratovich M. et al. The product of proliferation disrupter is concentrated at centromeres and required for mitotic chromosome condensation and cell proliferation in Drosophila // Genes and Development. 1997. Vol. 11. P. 213–225.

2. Jagannathan M., Cummings R., Yamashita Y. M. The modular mechanism of chromocenter formation in Drosophila // Elife. 2019. Vol. 8. P. e43938.

3. Talbert P. B., Kasinathan S., Henikoff S. Simple and complex centromeric satellites in Drosophila sibling species // Genetics. 2018. Vol. 208. P. 977–990.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-276

ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ AMPLISEQ FOCUS PANEL ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО

TARGETED RNA-SEQ (AMPLISEQ FOCUS PANEL) IN PATIENTS WITH ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN LUNG CANCER

Ю. С. Станкевич, А. Н. Щаюк, Е. П. Михаленко, А. В. Горбач, А. В. Кильчевский

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Y. S. Stankevich, A. N. Shchayuk, A. P. Michalenko, A. V. Gorbach, A. V. Kilchevsky

Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk

✉ j.bulanovich@igc.by

Аннотация

Исследован уровень экспрессии генов, представленных в панели AmpliSeq Focus Panel для пациентов с аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого. Проведена оценка дифференциальной экспрессии, на основании которой можно судить о достоверных различиях между группами по генам *ROS1*, *TBP* и *ITGB7*. В части образцов выявлены химерные гены *EML4:ALK* и *MET*.

Abstract

AmpliSeq Focus Panel workflow has been conducted in samples of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients. Differential expression analysis on DESeq2 showed significant difference between these two groups by *ROS1, TBP* and *ITGB7* genes, overall expression rates were higher in *ROS1*, *TBP* and MYC. *EML4:ALK* and *MET* fusions were found in several samples from patients with adenocarcinoma.

Важнейшую роль в возникновении и развитии рака легкого (РЛ) играют гены, которые являются частью сигнальных путей, контролируют пролиферацию, рост и дифференциацию клеток. Некоторые онкогены способны образовывать химеры с другими участками генома, что может приводить к измененной клеточной сигнализации, неконтролируемому делению и повышенной выживаемости клеток. Существует две основные группы химерных генов. К первой относятся рецепторы тирозин-киназ (*ALK, RET*, *ROS1, NTRK1/2/3, FGFR1/2/3, EGFR, ERBB2, ERBB4*, *LTK*), ко второй — гены MAPK-пути (*RASGRF1*, *BRAF*) [1]. Мы проанализировали опухолевую ткань пациентов с двумя гистологическими типами РЛ, чтобы оценить общий уровень экспрессии, определить наличие химерных генов и сравнить группы пациентов.

Для изучения дифференциальной экспрессии было взято 28 образцов ДНК пациентов с плоскоклеточным раком легкого (ПЛ) и 21 образец — с аденокарциномой (АК). Подготовка к секвенированию осуществлялась с помощью набора AmpliSeq Illumina Focus Panel.

Результирующие fastq-файлы после секвенирования загружались на платформу BaseSpace (Illumina) и использовались для запуска приложения RNA Amplicon v.2.1.0, которое производило выравнивание последовательности на референсный геном с помощью алгоритма BWA и осуществляло подсчет дифференциальной экспрессии посредством программы DESeq2.

После биоинформатической обработки производился анализ полученных данных с помощью языка программирования Python: работа с таблицей, полученной от DESeq2, производилась инструментами пакета Pandas (очистка данных, удаление ампликонов с нулевыми каунтами и off target ампликонов, удаление данных с p-value > 0,05). В таблице представлено достоверное различие экспрессии между группами АК и ПЛ.

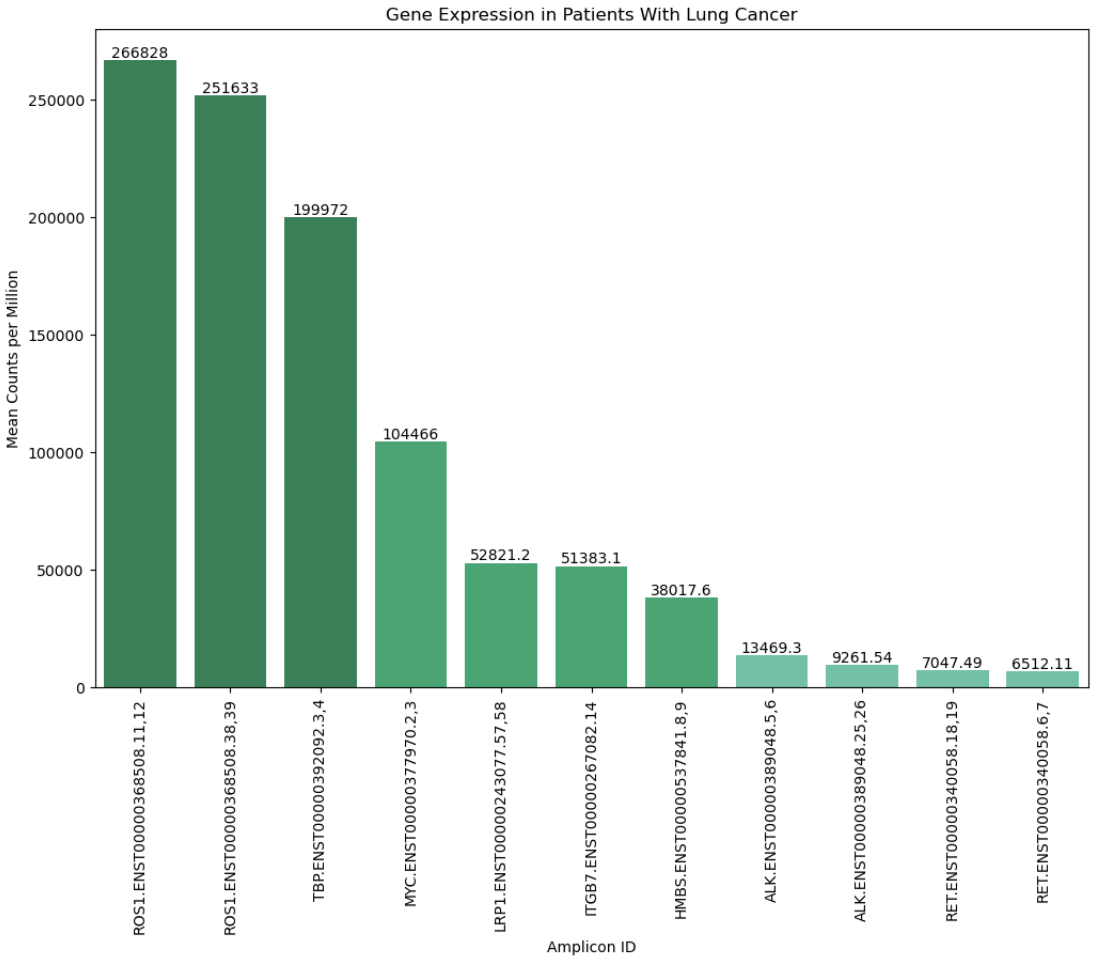
Дифференциальная экспрессия между группами АК и ПЛ

Amplicon ID	Adenocarcinoma	Squamous Cell Carcinoma	log2Fold Change	p-value
ROS1 ENST00000368508.38,39	22728,274	9841,329	-1,2075	0,00652
ROS1 ENST00000368508.11,12	24854,318	9870,742	-1,3322	0,00097

© Ю. С. Станкевич, А. Н. Щаюк, Е. П. Михаленко, А. В. Горбач, А. В. Кильчевский, 2024

Amplicon ID	Adenocarcinoma	Squamous Cell Carcinoma	log2Fold Change	p-value
TBP ENST00000392092.3,4	10010,329	13860,781	0,4695	0,00579
ITGB7 ENST00000267082.14	2469,688	3638,091	0,5588	0,01783

Сравнительный анализ экспрессии среди всей выборки проводился на данных, нормализованных относительно общего количества прочтений на образец. Для выявления наиболее экспрессируемых генов также использовались инструменты Python (Pandas, NumPy), которые позволили отобрать ампликоны с ненулевой встречаемостью и вывести среднее значение каунтов для каждого из них. Графическое отображение полученных данных осуществлялось с помощью библиотек Matplotlib и Seaborn (см. рисунок).



Экспрессия генов в образцах РЛ

Также в трех образцах аденокарциномы алгоритм программы RNA Amplicon обнаружил химерный ген EML4:ALK (E13:A20), в одном — EML4:ALK (E5,6:A20). Эти перестройки более характерны для молодых (< 60 лет) некурящих женщин с АК [2] и встречаются в 3–5 % случаев. Ген ALK активно экспрессируется на ранних этапах развития организма и в норме не активен во взрослом возрасте, однако при появлении в нем изменений он будет играть ключевую роль в опухолевом процессе, так как участвует в регуляции PI3K-AKT, JAK-STAT и MAPK сигнальных путей, которые, в свою очередь, ответственны за важнейшие клеточные процессы: рост, пролиферация, клеточный цикл и апоптоз [1, 3, 4]. В одном из образцов АК также детектировалась химера MET (MET 13: MET 15). MET является протоонкогеном, который, так же как и ALK, регулирует деятельность различных сигнальных путей (RAS/ERK/MAPK, PI3K/AKT, Wnt/β-catenin, STAT), которые, помимо вышеописанных функций, также отвечают за миграцию инвазию и ангиогенез [3].

В нашем исследовании мы оценили общую экспрессию генов у пациентов с раком легкого, выявили гены, экспрессия которых значительно различается в образцах аденокарциномы и плоскоклеточного РЛ, а также опре-

делили наличие химерных генов в некоторых образцах. Эти данные важны как для понимания процессов канцерогенеза в целом, так и для лечения пациентов с использованием таргетной терапии, которая на данный момент применяется для ROS1-, ALK- и MET-положительных РЛ. Полученные промежуточные результаты будут использованы в нашей дальнейшей работе для возможного определения генов-предикторов чувствительности к терапии пациентов РЛ.

Литература

1. Harada G. et al. Rare molecular subtypes of lung cancer // Nature Reviews Clinical Oncology. 2023. Vol. 20 (4). P. 229–249.

2. Zhou J. X. et al. Oncogenic driver mutations in patients with non-small cell lung cancer at various clinical stages // Annals of Oncology. 2013. Vol. 24 (5). P. 1319–1325.

3. Chevallier M. et al. Oncogenic driver mutations in non-small cell lung cancer: Past, present and future // WJCO. 2021. Vol. 12 (4). P. 217–237.

4. Stanzione B. et al. Therapeutical options in ROS1-rearranged advanced non-small cell lung cancer // Intern. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24 (14).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-277

ВЫБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР НЕЙТРОФИЛОВ СЕЛЕЗЕНКИ ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ И МЫШЕЙ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ *

SELECTION OF REFERENCE GENES FOR QUANTITATIVE RT-PCR OF SPLENIC NEUTROPHILS FROM HEALTHY AND TUMOR-BEARING MICE

Х. Сунбули[1,2], Л. А. Алексеева[1], О. В. Марков[1], А. В. Сенькова[1], И. А. Савин[1], Н. Л. Миронова[1]

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

Kh. Sounbuli[1,2], L. A. Alekseeva[1], O. V. Markov[1], A. V. Sen'kova[1], I. A. Savin[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

Аннотация

Экспрессия референсных генов у нейтрофилов может сильно варьироваться при изменении иммунного статуса организма, что может приводить к неправильным выводам при анализе результатов количественной ОТ-ПЦР. В этой работе была изучена стабильность экспрессии 10 потенциальных референсных генов в нейтрофилах селезенки здоровых и мышей-опухоленосителей. После анализа *Hprt1* выдвигается как лучший и стабильно-экспрессируемый референсный ген.

Abstract

The expression of reference genes in neutrophils can change dramatically according to the immune status of the organism, which leads to incorrect conclusions when analyzing the results of quantitative RT-PCR. In this study, we investigated gene expression stability of 10 reference genes in the splenic neutrophils of healthy and tumor-bearing mice. *Hprt1* was proposed as the most applicable stable-expressed reference gene.

Количественная ОТ-ПЦР является одним из наиболее популярных методов для изучения экспрессии генов в разных клетках, в том числе в иммунных клетках. Для нормализации результатов ОТ-ПЦР используются референсные гены (или гены домашнего хозяйства), стабильно экспрессирующиеся в изучаемых клетках при разных обстоятельствах. Однако экспрессия потенциальных референсных генов в иммунных клетках, в частности нейтрофилах, может быть нестабильной при изменении иммунного статуса организма, а использование нестабильно экспрессируемого референсного гена приведет к неправильной интерпретации результатов. Таким образом, целью этой работы был выбор референсного гена для исследований экспрессии генов в нейтрофилах в состоянии покоя и при активации. В качестве покоящихся нейтрофилов (без иммунного статуса) были использованы нейтрофилы костного мозга. Нейтрофилы селезенки, в отличие от нейтрофилов костного мозга, могут отражать функциональное состояние нейтрофилов, выполнивших свою роль в организме, например опухоль-ассоциированных нейтрофилов, и поступивших в селезенку для клиренса, что свидетельствует о возможности их использования в качестве активированных нейтрофилов.

Для получения опухоль-ассоциированных нейтрофилов селезенки были использованы модели карциномы легкого Льюис LLC и лимфосаркома RLS_{40}. LLC является стабильной моделью, где у всех мышей развивается опухоль, однако RLS_{40} — более вариабельная модель, где встречаются мыши со спонтанно редуцируемой опухолью, вероятно, из-за большей активации иммунного ответа. Нейтрофилы были выделены из костного мозга здоровых мышей и из селезенок здоровых мышей или мышей-опухоленосителей. РНК выделяли с помощью реагента Ризол (diaGene), затем готовили кДНК из 2 мкг РНК с помощью обратной транскриптазы MMuLV-RH (Биолабмикс). Экспрессия референсных генов (*Actb, Hprt1, Gapdh, Sdha, Ywhaz, Tbp, B2m, Eef2, Rpl13a, Rack1*) была изучена с помощью ОТ-ПЦР.

Для анализа стабильности экспрессии референсных генов были использованы следующие инструменты: 1) BestKeeper, который предсказывает стабильность гена на основе низких значений стандартного отклонения (SD) и коэффициента вариации (CV) для Ct разных референтных генов [1]; 2) NormFinder, который оценивает

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 22-14-00289).

© Х. Сунбули, Л. А. Алексеева, О. В. Марков, А. В. Сенькова, И. А. Савин, Н. Л. Миронова, 2024

не только общую вариацию экспрессии, но и анализирует межгрупповую и внутригрупповую вариации экспрессии [2], geNorm, который вычисляет стабильность экспрессии референсного гена как среднее попарное отклонение гена от всех других протестированных референсных генов [3]; Delta Ct (ΔCt), метод, который предполагает, что если значение ΔCt между двумя референсными генами остается постоянным при анализе в разных образцах, это означает, что оба гена стабильно экспрессируются в этих образцах, а если ΔCt изменяется, то один или оба гена экспрессируются вариабельно [4]; RefFinder, веб-инструмент, который объединяет результаты вышеупомянутых использованных программ и вычисляет значение стабильности для каждого референсного гена для общего итогового рейтинга [5].

Самыми стабильными референсными генами при анализе BestKeeper оказались *Hprt1*, *Tbp*, *Gapdh*. где значения SD для Ct референтных генов были 0,29, 0,49 и 0,5 соответственно. NormFinder предлагал *Hprt1*, *Tbp* и *Ywhaz* как самые стабильные гены, где значение стабильности оказались 0,32, 0,41 и 0,79 соответственно. Алгоритм geNorm показал, что самые стабильные референсные гены — это *Actb*, *Gapdh*, *Ywhaz,* а *Hprt1* оказался на пятом месте после *Tbp*. ΔCt метод предлагал *Hprt1*, *Tbp* и *Ywhaz* как самые стабильные гены. С помощью RefFinder в финальном составном рейтинге гены были расположены в следующем порядке: *Hprt1, Tbp, Gapdh, Actb, Ywhaz, Eef2, Sdha, Rack1, B2m, Rpl13a*, где *Hprt1* был выявлен как самый стабильный референсный ген.

Таким образом, *Hprt1* позиционируется нами как наиболее оптимальный референсный ген для исследований экспрессии генов в нейтрофилах селезенки здоровых мышей и мышей-опухоленосителей.

Литература

1. Pfaffl M. W., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper — Excel-based tool using pair-wise correlations // Biotechnology Letters. 2004. Vol. 26. P. 509–515.

2. Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets // Cancer research. 2004. Vol. 64. P. 5245–5250.

3. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // Genome biology. 2002. Vol. 3.

4. Silver N., Best S., Jiang J., Thein S. L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR // BMC molecular biology. 2006. Vol. 7. P. 33.

5. Xie F., Wang J., Zhang B. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes // Functional & Integrative Genomics. 2023. Vol. 23. P. 125.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-278

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА WHIA У МОЛЛИКУТ В КОНТЕКСТЕ МИНИМАЛЬНОГО ГЕНОМА*

INVESTIGATION OF WHIA PROTEIN FUNCTION IN MOLLICUTES IN THE MINIMAL GENOME CONTEXT

Е. А. Цой, Д. В. Евсютина, Г. Ю. Фисунов, В. М. Говорун

НИИ системной биологии и медицины, Москва

E. A. Tsoy, D. V. Evsyutina, G. Y. Fisunov, V. M. Govorun

Scientific Research Institute of Systems Biology and Medicine, Moscow

✉ eatsoy2012@gmail.com

Аннотация

WhiA — консервативный белок, присутствующий у многих групп бактерий. Его функции в разных группах существенно различаются и плохо изучены за пределами стрептомицетов. У последних WhiA является регулятором споруляции. Мы показали, что у микоплазм (молликут) WhiA является регулятором экспрессии оперона рибосомных белков и сенсором АТФ. Нокдаун гена *whiA* у *Mycoplasma gallisepticum* приводит к снижению скорости роста, что говорит о важности.

Abstract

WhiA is a conserved protein that is widespread in several groups of bacteria. Its function significantly differs across bacterial taxons and is poorly understood except for its activity in sporulation control in Streptomyces. We demonstrated that in mycoplasmas (Mollicutes) WhiA is a transcriptional regulator of the ribosomal proteins operon and is an ATP sensor. Knockdown of *whiA* gene results in the significant growth retardation which indicates its importance.

Микоплазмы (*Mollicutes*) — бактерии с редуцированным геномом, минимальный размер которого составляет 580 тыс. п. о. (*Mycoplasma genitalium*). Как следствие, все микроорганизмы данного класса обладают рядом особенностей, отличающих их от классических модельных объектов (*E. coli, B. subtilis*). Приспособление микоплазм к паразитарному образу жизни привело к редукции клеточной стенки, метаболизма, генома и систем регуляции его экспрессии. В связи с общим упрощением своей организации бактерии класса *Mollicutes* с начала 1980-х гг. стали использоваться в качестве моделей для понимания основных принципов устройства клеток. В 2016 г. была опубликована работа по получению бактерии с редуцированным синтетическим геномом *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn3.0. Его размер равен 531 тыс. пар оснований и состоит из 473 генов, включая ген кодирующий белок WhiA [1]. Таким образом, этот белок является жизненно необходимым. Несмотря на то что WhiA присутствует во многих бактериях и вызывает интерес ученых уже на протяжении 50 лет, роль его в жизни бактериальных клеток пока неясна. Согласно опубликованным данным, в разных бактериях он задействован в разных процессах: регуляция экспрессии генов при споруляции, поддержание структуры и целостности хроматина [2, 3].

В данной работе мы исследовали белок WhiA из *Mycoplasma gallisepticum*. Мы показали, что у микоплазм данный белок является регулятором транскрипции оперона *rplJ*, кодирующего гены рибосомных и некоторых других белков домашнего хозяйства. Мы показали, что WhiA является сенсором нуклеозид-трифосфатов, т. е. состояния энергизации клетки. Полученные нами мутанты с нокдауном гена WhiA (методом CRISPR-интерференции) демонстрируют сниженную скорость роста и увеличенную экспрессию шаперонов, что может говорить о системном нарушении организации протеома. Мы синтезировали ген pH-сенсора SypHer3s с кодонным составом, оптимальным для микоплазм. Далее были получены двойные трансформанты — с нокдауном WhiA и экспрессией SypHer3s. Далее было проведено исследование способности клеток с нокдауном WhiA удерживать внутриклеточный pH в определенных рамках относительно среды.

Литература

1. Fisunov G. Y. et al. Reconstruction of Transcription Control Networks in Mollicutes by High-Throughput Identification of Promoters // Front. Microbiol. 2016. Vol. 7. P. 1–15.

2. Bohorquez L. C. et al. Metabolic and chromosomal changes in a Bacillus subtilis whiA mutant // Microbiol. Spectr. 2023. Vol. 11 (6). P. e0179523

3. Lee J. H. et al. Corynebacterium glutamicum whiA plays roles in cell division, cell envelope formation, and general cell physiology // Antonie Van Leeuwenhoek. 2020. Vol. 113 (5). P. 629–641.

* Работа финансировалась по заданию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках темы «Создание искусственных клеточных систем» (рег. № 1022040800170-3-1.6.23).

© Е. А. Цой, Д. В. Евсютина, Г. Ю. Фисунов, В. М. Говорун, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-279

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СИЛИМАРИНА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА *

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SILYMARIN IN CEREBRAL ISCHEMIA

Ш. И. Чалабов[1], Н. К. Кличханов[2]

[1] *Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург*
[2] *Дагестанский государственный университет, Махачкала*

Sh. I. Chalabov[1], N. K. Klichkhanov[2]

[1] *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg*
[2] *Dagestan State University, Makhachkala*

✉ biowulf05@gmail.com

Аннотация

Изучено влияние силимарина на окислительный стресс при неполной ишемии головного мозга у крыс. Ишемия приводит к развитию оксидативного стресса, который проявляется в увеличении содержания продуктов перекисного окисления липидов и белков, и снижению работы антиоксидантной системы. В то же время диета с силимарином препятствует развитию оксидативного стресса при ишемии головного мозга у крыс.

Abstract

The effect of silymarin on oxidative stress in incomplete cerebral ischemia in rats was studied. Ischemia leads to the development of oxidative stress, which is manifested by an increase in the content of lipid and protein peroxidation products and a decrease in the antioxidant system. At the same time, diet with silymarin prevents the development of oxidative stress during cerebral ischemia in rats.

Силимарин — комплекс биофлавоноидов семян расторопши пятнистой, основную массу которого составляют четыре соединения: силибин, изосилибин, силикристин и силидианин. Обладает широким спектром биологической активности и применяется как гепатопротектор, важным свойством которого является антиоксидантный эффект. Так как силимарин в настоящее время применяется как гепатопротектор с выраженным антиоксидантным эффектом, нами было сделано предположение, что это вещество может быть использовано также для терапии ишемии мозга. Известно, что одним из ключевых звеньев патогенеза повреждения нервной ткани при церебральной ишемии является оксидативный стресс, в результате которого запускается каскад патобиохимических реакций и происходит сдвиг равновесия в системе биологического окисления в сторону активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и белков с одновременным ослаблением резервов антиоксидантной системы защиты организма. Кроме того, некоторые литературные источники также указывают на то, что силимарин может применяться как нейропротектор. В связи с этим целью исследования было изучение антиоксидантных свойств силимарина при ишемии мозга.

Опыты проводили на крысах линии Wistar массой ~180–200 г. Животные случайным образом были распределены на 3 группы: 1 — ложнооперированные крысы (контроль); 2 — крысы с ишемией/реперфузией головного мозга; 3 — крысы с ишемией/реперфузией головного мозга, получавшие силимарин. В эксперименте воспроизводилась неполная ишемия головного мозга путем окклюзии обеих сонных артерий в течение 1 ч, после чего лигатуры снимали и через час реперфузии животных использовали в эксперименте. Из коры головного мозга выделяли синаптосомы и синаптические мембраны. В мембранах синаптосом определяли маркеры окислительной модификации белков (карбонильные и тиоловые группы, SH-группы) а в синаптосомах продукты ПОЛ (малоновый диальдегид, МДА), содержание восстановленного глутатиона (GSH) и активность гидрофильных антиоксидантов.

В результате оказалось, что окклюзия сонных артерий и последующая реперфузия приводит к повышению исходного содержания МДА в суспензии синаптосом на 67 % относительно контроля. В инкубируемых *in vitro* пробах синаптосом в присутствии прооксидантов (Fe^{2+} + аскорбат) накопление МДА после реперфузии возрастает на 48 % по отношению к контролю. Постишемическая реперфузия приводит к резкому увеличению (на 115 %)

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

© Ш. И. Чалабов, Н. К. Кличханов, 2024

исходного уровня карбонилов в мембранных белках. Ишемия/реперфузия приводит к существенному накоплению карбонилов (на 81 %) в присутствии системы Фентона. Анализ другого маркера окислительной модификации белков — SH-групп — показал, что их содержание в белках мембран синаптосом при постишемической реперфузии снижается на 41 %. Развитие окислительного стресса в мозге происходит на фоне снижения антиоксидантной защиты. Так, через 1 ч реперфузии в синаптосомах общая антиокислительная активность снижается на 39 %, а содержание GSH — на 51,4 % по отношению к контролю. Таким образом, постишемическая реперфузия стимулирует окислительную модификацию как липидов, так и белков синаптосом, что свидетельствует об интенсивном образовании АФК в нейронах.

Диета с биофлавоноидами расторопши предотвращает повышение как исходного уровня МДА в синаптосомах, так и его накопление индуцированного оксидантами после реперфузии. На фоне препарата в белках мембран синаптосом не повышается количество карбонильных групп и не снижается количество SH-групп после реперфузии, предотвращается также накопление карбонильных групп в белках мембран синаптосом *in vitro* в среде Фентона после реперфузии. У данной группы животных также не происходит снижение общей антиокислительной активности и содержания GSH в синаптосомах в период постишемической реперфузии. Можно заключить, что постишемическая реперфузия стимулирует окислительную модификацию как липидов, так и белков синаптосом, что свидетельствует об интенсивном образовании АФК в нейронах. В то же время биофлавоноиды расторопши пятнистой способны оказывать антиоксидантное нейропротекторное действие в условиях церебральной ишемии/реперфузии.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-280

УВЕЛИЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НОЗЕМАТОЗОМ ВБЛИЗИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕССОРА *

AN INCREASE IN THE INCIDENCE OF NOSEMOSIS NEAR THE ENVIRONMENTAL STRESSOR

Н. Д. Шамаев[1,2], В. В. Сальников[1,4], Е. С. Кошпаева[2], К. В. Сычев[1,2]

[1]Казанский федеральный университет
[2]Казанский государственный медицинский университет
[3]Казанская государственная медицинская академия
[4]Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центр РАН

N. D. Shamaev[1,2], V. V. Salnikov[1,4], E. C. Koshpayeva[2], K. V. Sychev[1,2]

[1]Kazan Federal University
[2]Kazan State Medical University
[3]Kazan State Medical Academy
[4]Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Kazan Scientific Center RAS

✉ nikolai.shamaev94@mail.ru

Аннотация

Нозематоз является серьезной проблемой, влияющей на здоровье пчел и продуктивность ульев. Исследование предполагает, что повышенная распространенность нозематоза вблизи горнодобывающих районов может быть связана с отсроченным вредным воздействием на рабочих пчел и всю семью неизвестных стрессовых факторов окружающей среды, высвобождаемых из горнодобывающего района.

Abstract

Nosemosis is a significant issue affecting bee health and hive output, is a major concern for beekeepers worldwide. The study suggests that the increased prevalence of nosemosis near mining areas may be due to delayed exposure of worker bees and colonies to unknown environmental stressors released from the mining area.

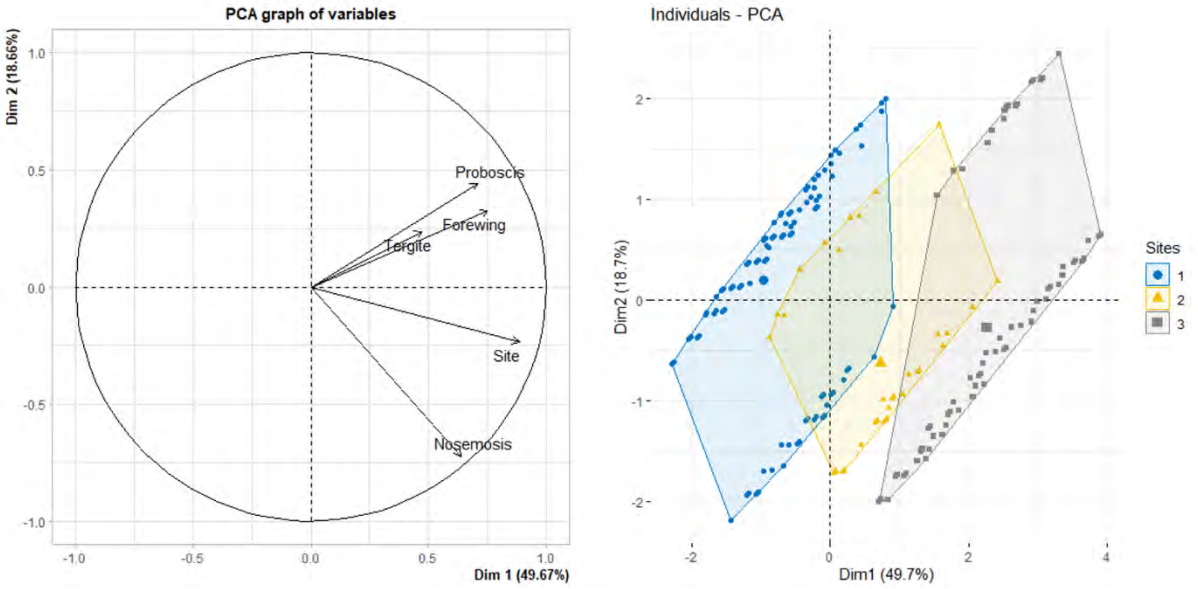
Нозематоз является серьезной проблемой пчеловодов во всем мире, влияющей на здоровье пчел и продуктивность ульев [1]. Понимание распространенности данного заболевания и риск-факторов возникновения заболевания имеет решающее значение для разработки эффективных планов управления по защите популяций медоносных пчел. Добыча полезных ископаемых — это инвазивная операция, последствия которой могут быть долгосрочными для популяций пчел. Для оценки связи между ноземозом и антропогенным воздействием горных работ были исследованы три участка в руандийском регионе: на участке 1 пасеки находились в 5 км от района добычи, на участке 2 пасеки находились в 2,5 км от района добычи, а на участке 3 пасеки находились внутри района добычи. Процесс отбора проб проводился в темноте, а для консервации проводилась дополнительная сушка на солнце. Споры вида *Nosema* были обнаружены у 69 из 496 (13,91 %, 95 % доверительный интервал; ДИ: [11,05–17,34]) рабочих медоносных пчел с участка 1, 48 из 63 (76,19 %, 95 % доверительный интервал; ДИ: [63,5–85,64]) с участка 2 и 156/191 (81,67 %, 95 % доверительный интервал; ДИ: [75,29–86,75]) с участка 3. Метод главных компонент был показал совокупную долю дисперсии 66,56 %. Векторы переменных «хоботок», «переднее крыло» и «тергит» положительно коррелировали (см. рисунок). Вектор переменной «превалентность нозематоза», морфометрические переменные и переменная «участок отбора проб» показали корреляцию между собой. Переменная «превалентность нозематоза» и морфометрические переменные не показали корреляции. Можно сказать, что морфотипы медоносных пчел на участках 2 и 3 в основном имеют более крупный тергит, более длинный хобот и переднее крыло, чем на участке 1. В сравнении между участками 1 и 2 с участком 3, у большинства медоносных пчел с участка 1 отсутствует нозематоз.

Растения, выращиваемые на загрязненной почве, аккумулируют тяжелые металлы, образующиеся при добыче полезных ископаемых. Споры *Nosema* sP., присутствующие на цветках или в почве, сохраняются в течение нескольких лет и инвазивны для насекомых. Медоносные пчелы зависят от пыльцы и нектара растений, а дли-

* Часть работы выполнена при финансовой поддержке государственного задания для КИББ ФИЦ «Казанский научный центр РАН» (электронная микроскопия).

© Н. Д. Шамаев, В. В. Сальников, Е. С. Кошпаева, К. В. Сычев, 2024

тельное воздействие тяжелых металлов может привести к постепенному накоплению в популяции пчел [2]. Повышенная распространенность нозематоза вблизи района добычи может быть связана с отсроченным вредным воздействием на рабочих пчел и всю семью неизвестных стрессоров окружающей среды, например, таких как тяжелые металлы.



Оценка распространенности нозематоза на территории исследования с использованием метода главных компонент

Литература

1. Shamaev N. D., Shuralev E. A., Mukminov M. N. Current status of *Nosema* sP. infection cases in *Apis mellifera* in Eurasian countries and *Ptp3* gene haplotypes in the Republic of Tatarstan, Russia // Vet. Res. Commun. 2024.

2. Burden C. M., Morgan M. O., Hladun K. R. et al. Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behavior // Sci. Rep. 2019.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-281

ЭФФЕКТЫ НАКОПЛЕНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ПОЗНО-ТОНИЧЕСКИХ МЫШЦАХ ПРИ БЕЗДЕЙСТВИИ *

EFFECTS OF CALCIUM ACCUMULATION IN SLOW-TONIC MUSCLES UNDER DISUSE

К. А. Шарло, Д. А. Сидоренко, И. Д. Львова, С. А. Тыганов, Б. С. Шенкман

Институт медико-биологических проблем ГНЦ РФ РАН, Москва

K. A. Sharlo, D. A. Sidorenko, I. D. Lvova, S. A. Tyganov, B. S. Shenkman

Institute of Biomedical Problems SSC RF RAS, Moscow

✉ sharlokris@gmail.com

Аннотация

Инактивация мышц, как и их нагрузка, приводит к накоплению ионов кальция в мышечных волокнах, однако особенности этого процесса в обоих случаях различны, и в первом случае он приводит к атрофии и мышечной слабости. Применение фармакологических модуляторов активности кальциевых каналов предотвращает мышечную слабость после длительного бездействия.

Abstract

Inactivation of muscles, as well as their load, leads to the accumulation of ions in muscle fibers, however, the details of this process are different in both cases and in the first case it leads to atrophy and muscle weakness. The use of pharmacological modulators of calcium channels activity prevents muscle weakness after prolonged inactivity.

В условиях космического полета, а также, в меньшей степени, при длительном постельном режиме наблюдается уменьшение влияния силы тяжести Земли на опорно-двигательный аппарат. Это приводит к функциональной разгрузке скелетных мышц, то есть к отсутствию механической нагрузки на мышцу, и инактивации позно-тонических мышечных волокон. При этом происходит атрофия мышц, медленные мышечные волокна трансформируются в быстрые, снижается мышечная сила, увеличивается утомляемость. Эти изменения негативно влияют на качество жизни и производительность труда людей. Одной из наиболее подверженных данным негативным изменениям мышц является камбаловидная мышца, которая у человека участвует в поддержании вертикального положения тела, ходьбе и беге.

Уже на 2–3-й день функциональной разгрузки в миоплазме скелетных мышц наблюдается накопление ионов кальция, которое сохраняется не менее 14 дней [1]. В отличие от кратковременного накопления кальция при физической нагрузке, при механической разгрузке наблюдается относительно небольшое по амплитуде, но длительное увеличение содержания ионов кальция, подобное тому, что наблюдается при различных патологических состояниях, например при мышечной дистрофии Дюшенна или старении. Известно, что чрезмерное длительное накопление кальция в мышечных волокнах может привести к нарушению функции митохондрий, включая активацию митофагии, генерацию активных форм кислорода (АФК) и окисление рианодиновых рецепторов [2].

Мы предположили, что окисление рианодиновых рецепторов АФК, приводящее к их спонтанному открытию, может вызывать истощение запасов кальция в саркоплазматическом ретикулуме, что приводит к снижению максимальной силы и повышению мышечной утомляемости. Препарат S107 препятствует АФК-зависимому окислению рианодиновых рецепторов, что было показано на модели сердечных патологий [3].

Двадцать четыре самца крыс Вистар (в возрасте двух с половиной месяцев) были случайным образом распределены в одну из трех групп (по восемь животных в каждой группе): контрольные крысы с введением плацебо (10 % ДМСО в питьевой воде, «С»), 7-суточная разгрузка задних конечностей крыс с плацебо («7HS») и 7-дневная разгрузка задних конечностей крыс с введением стабилизатора рианодиновых рецепторов S107 (50 мг/кг в 10 % ДМСО в питьевой воде «7H+S»). Разгрузку задних конечностей осуществляли методом вывешивания за хвост [4]. После эксперимента крыс эвтаназировали под бромэтаноловым наркозом.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-75-10048). Эксперименты проведены в Институте медико-биологических проблем РАН. Комитет по биоэтике РАН рассмотрел и одобрил все эксперименты на животных для данного исследования.

© К. А. Шарло, Д. А. Сидоренко, И. Д. Львова, С. А. Тыганов, Б. С. Шенкман, 2024

Мы проанализировали уровень утомляемости камбаловидной мышцы *ex vivo*. Камбаловидные мышцы инкубировали в течение 15 мин в охлажденном растворе Рингера — Кребса при постоянной перфузии с 95%-м карбогеном (O2 + C2), а затем помещали в тестовую ванну с фиксированной температурой 37 °C. Мышца была прикреплена сухожилиями к датчику силы с одной стороны и к фиксированному крючку с другой стороны. Оптимальную длину мышц (L0) определяли с помощью цифрового штангенциркуля. Мышцу устанавливали на длину L0 и подвергали электрической стимуляции частотой 40 Гц в течение 2 с. Регистрировали максимальную силу тетанического сокращения. Для определения индекса утомления камбаловидной мышцы выполняли серию из 20 тетанических сокращений в течение одной минуты с паузой между сокращениями 1 с. Для индекса утомления отношение силы сокращения после 20 повторений делили на максимальную силу сокращения, измеренную в течение теста. Результаты нормализовали на физиологическую площадь поперечного сечения мышцы.

После семи дней разгрузки задних конечностей масса камбаловидной мышцы достоверно снизилась как в группах 7H, так и в группах 7H+S (35,39 ± 3,41 мг и 41,10 ± 9,19 мг соответственно) по сравнению с контрольными крысами (65,96 ± 12 мг). В то же время введение препарата S107 предотвращало вызванное разгрузкой снижение индекса мышечного утомляемости. В группе 7H наблюдалось снижение индекса утомляемости на 19 % по сравнению с контролем, а в группе 7H+S это снижение было полностью предотвращено. Более того, в группе 7H наблюдалось снижение максимальной силы на 39 %, но введение S107 предотвратило эти изменения.

Таким образом, мы показали, что в изменения механических характеристик мышц при функциональной разгрузке вносит вклад дестабилизация и окисление рианодиновых рецепторов саркоплазматического ретикулума.

Литература

1. Ingalls C. P., Warren G. L., Armstrong R. B. Intracellular Ca2+ transients in mouse soleus muscle after hindlimb unloading and reloading // J. Appl. Physiol. 1999. Vol. 87. P. 386–390.

2. Andersson D. C., Betzenhauser M. J., Reiken S. et al. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging // Cell Metab. 2011. Vol. 14. P. 196–207.

3. Guo W., Zhu C., Yin Z. et al. The ryanodine receptor stabilizer S107 ameliorates contractility of adult Rbm20 knockout rat cardiomyocytes // Physiol. Rep. 2021. Vol. 17. P. e15011.

4. Morey-Holton E. R., Globus R. K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects // J. Appl. Physiol. 2002. Vol. 92, No. 4. P. 1367–1377.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-282

КСИЛОГЛЮКАН ЭНДОТРАНСГЛЮКОЗИЛАЗА/ГИДРОЛАЗА *NICOTIANA BENTHAMIANA* (NBXTH19) СОДЕРЖИТ ASN-СВЯЗАННЫЙ ГЛИКАН И УЧАСТВУЕТ В ОТВЕТЕ НА ВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ *

NICOTIANA BENTHAMIANA XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE NBXTH19 CONTAINS ASN-LINKED GLYCAN AND PARTICIPATES IN RESPONSE TO VIRAL INFECTION

Е. В. Шешукова[1], Н. М. Ершова[1], А. А. Антимонова[1,2], К. А. Камарова[1], Т. В. Комарова[1,2]

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

E. V. Sheshukova[1], N. M. Ershova[1], A. A. Antimonova[1,2], K. A. Kamarova[1], T. V. Komarova[1,2]

[1]*Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow*
[2]*Lomonosov Moscow State University*

✉ sheshukova@vigg.ru

Аннотация

Среди клеточных белков, участвующих в ответах растения на вирусную инфекцию, многие являются гликопротеинами, проходящими по пути традиционной секреции через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. Причем наличие N-связанных гликанов необходимо для их функционирования. В данной работе был проведен анализ белка NbXTH19 и экспериментально показано наличие в нем сайта N-гликозилирования.

Abstract

Many cellular proteins involved in plant responses to viral infections are glycoproteins, which are secreted via the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus where they undergo glycosylation. Additionally, the presence of N-linked glycans is crucial for their function. In this study, the NbXTH19 protein was examined, and an N-glycosylation site within it was experimentally confirmed.

Клеточная стенка (КС) является одним из наиболее важных защитных барьеров растительной клетки. Эта структура состоит из разнообразных полисахаридов, белков и пектина: он формирует матрикс, в котором находится сеть целлюлозно-ксилоглюкановых фибрилл. КС достаточно пластична благодаря различным ферментам, модифицирующим полисахаридно-пектиновую основу. Белки класса ксилоглюкан эндотрансглюкозилаз/гидролаз (XTH) играют важную роль в изменении структуры КС. Показано, что XTH участвуют в перестройке клеточной стенки во время роста и развития растения. Однако свежие данные четко указывают на то, что белки этого семейства принимают активное участие в ответах на стрессовые воздействия [1]. Также имеются свидетельства того, что XTH могут быть вовлечены в ответ растительной клетки на вирусную инфекцию [2]. Тем не менее многообразие и многочисленность представителей этого семейства белков оставляет огромное поле для исследования их структурных и функциональных особенностей, а также роли в реакциях растений на различные виды стрессов. Ранее мы идентифицировали ксилоглюкан эндотрансглюкозилазу растения *Nicotiana benthamiana*, имеющую наибольшую степень сходства с XTH5 *Arabidopsis thaliana* и XTH18/19 *N. tabacum* и обозначаемую в дальнейшем NbXTH19. Показано, что экспрессия *NbXTH19* коррелирует с экспрессией клеточного фактора NbKPILP, который вовлечен в регуляцию передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро, а также стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт вируса табачной мозаики (ВТМ) в *N. benthamiana*, тем самым способствуя созданию благоприятных условий для эффективного развития инфекции. NbKPILP содержит секреторный сигнальный пептид, направляющий его по пути традиционной секреции, а также три остатка аспарагина, присоединение гликанов к которым является необходимым для нормального функционирования данного белка [3]. В настоящей работе мы показали, что, согласно биоинформатическому анализу, последовательность NbXTH19 включает в себя 21-аминокислотный сигнальный пептид и сайт N-гликозилирования (Asn114). Для экспериментального подтверждения секреции и гликозилирования NbXTH19 мы использовали два подхода: 1) отщепление потенциального N-связанного гликана с помощью PNGase F, которая осуществляет энзиматическое отщепление N-связанных гликанов от белка, и оценка изменения подвижности белка в полиакриламидном геле; 2) замена остатка аспарагина на аланин в составе NbXTH19 и сравнение электрофорети-

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 19-74-20031-П).

© Е. В. Шешукова, Н. М. Ершова, А. А. Антимонова, К. А. Камарова, Т. В. Комарова, 2024

ческой подвижности полученного мутантного варианта NbXTH19_N114A и NbXTH19, а также проверка его чувствительности к обработке PNGase F. Учитывая, что в растениях N-связанный гликан, как правило, содержит α1,3-фукозу, присутствие которой делает гликаны недоступными для отщепления PNGase F, мы использовали трансгенные растения *N. benthamiana* с нокдауном генов фукозил- и ксилозил-трансферазы. В этих растениях осуществляли транзиентную экспрессию конструкций, кодирующих NbXTH19 или NbXTH19_N114A, слитые с GFP, а затем проводили фракционирование растительного материала и обработку PNGase F. Вестерн-блот-анализ полученных экстрактов и детекция белка с помощью специфических антител против GFP показали, что 1) NbXTH19:GFP является чувствительным к PNGase F и меняет подвижность в геле в соответствие с ожидаемой после инкубации с PNGase F; 2) подвижность в геле NbXTH19_N114A:GFP не изменяется после обработки PNGase F. На основании полученных результатов мы заключили, что NbXTH19 направляется к месту конечной локализации по пути традиционной секреции через эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, является гликопротеином, содержащим N-связанный гликан в позиции 114. NbXTH19 может играть роль партнера провирусного фактора NbKPILP, принимать участие в модификации КС и регуляции пропускной способности плазмодесм при вирусной инфекции.

Литература

1. Ishida K., Yokoyama R. Reconsidering the function of the xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase family // J. Plant Res. 2022. Vol. 135, Iss. 2. P. 145–156.

2. Goyer A., Hamlin L., Crosslin J.M. et al. RNA-Seq analysis of resistant and susceptible potato varieties during the early stages of potato virus Y infection // BMC Genomics. 2015. Vol. 16, Iss. 1. P. 472.

3. Ershova N., Sheshukova E., Kamarova K. et al. Nicotiana benthamiana Kunitz peptidase inhibitor-like protein involved in chloroplast-to-nucleus regulatory pathway in plant-virus interaction // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-283

ШТАММ WMELPLUS БАКТЕРИИ *WOLBACHIA* ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER* К ТЕПЛОВОМУ СТРЕССУ, ИЗМЕНЕНИЯ В ТРАНСКРИПТОМЕ ХОЗЯИНА ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО ВЫЗВАНЫ ИЗМЕНЕНИЯМИ В ГЕНОМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИМБИОНТА *

STRAIN WMELPLUS OF *WOLBACHIA* BACTERIUM INCREASES *DROSOPHILA MELANOGASTER* RESISTANCE TO HEAT STRESS, CHANGES IN THE HOST TRANSCRIPTOME ARE HYPOTHETICALLY CAUSED BY ALTERATIONS IN THE INTRACELLULAR SYMBIONT GENOME

О. Д. Шишкина[1,2], М. А. Дерюженко[1], О. В. Андреенкова[1], М. А. Бобровских[1], Н. В. Шацкая[1], Г. В. Васильев[1], А. И. Клименко[1], А. Е. Коренская[1,2], Н. Е. Грунтенко[1]

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

O. D. Shishkina[1,2], M. A. Deryuzhenko[1], O. V. Andreenkova[1], M. A. Bobrovskikh[1], N. V. Shatskaya[1], G. V. Vasiliev[1], A. I. Klimenko[1], A. E. Korenskaia[1,2], N. E. Gruntenko[1]

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

✉ shishkinaod@bionet.nsc.ru

Аннотация

Штамм *Wolbachia* wMelPlus, повышающий стрессоустойчивость хозяина, содержит уникальную инверсию. Транскриптомный анализ линий *Drosophila melanogaster*, инфицированных штаммами wMelPlus и wMelCS [1 1,2], выявил, что ответ на инфекцию затрагивает более 100 генов. Главным кандидатом на ключевую роль в обеспечении стрессоустойчивости, вызванной wMelPlus, является ген коразонинового рецептора (*CrzR*).

Abstract

The wMelPlus strain of *Wolbachia*, which influences host stress resistance, contains a unique inversion (1/6 the length of the entire genome). Transcriptome analysis of *Drosophila melanogaster* lines infected with wMelPlus strain and wMelCS [1 1,2] strain revealed that the response to infection affects more than 100 genes. The corazonin receptor (*CrzR*) gene is a major candidate for a critical role in wMelPlus-induced stress resistance.

Wolbachia — это род внутриклеточных симбиотических бактерий, представленный множеством различных штаммов. Наиболее изучены взаимодействия в симбиотической системе «*Wolbachia* — насекомое». Несмотря на то что задокументировано огромное количество оказываемых этой бактерией эффектов на хозяина, механизмы этих влияний остаются загадкой. Исследование разных штаммов, которые изменяют фенотип хозяина, является основным подходом для изучения взаимодействий в подобных системах.

Был найден штамм вольбахии wMelPlus, повышающий устойчивость *Drosophila melanogaster* к острому тепловому стрессу. Секвенирование на платформах Illumina и Oxford Nanopore позволило собрать геномы этого штамма и штамма wMelCS [1 1,2], не оказывающего влияния на стрессоустойчивость хозяина. Показано, что штамм wMelPlus значительно отличается инверсией протяженностью в 1/6 всего генома от wMelCS [1 1,2] и других изученных штаммов. Поскольку прочие обнаруженные отличия генома штамма wMelPlus от других незначительны и не могут объяснить различие в фенотипах исследованных насекомых, предположительно, инверсия играет ключевую роль [1].

Мы предполагаем, что изменения в регуляции генов *Wolbachia*, возникшие в результате перестройки бактериального генома, послужили причиной возникновения стрессоустойчивого фенотипа насекомого-хозяина. Внутриклеточная природа этого симбионта затрудняет изучение его транскриптома, поэтому следующим шагом стало изучение транскриптомов инфицированных линий насекомого-хозяина. Для транскриптомного анализа были выбраны три линии *Drosophila melanogaster* с одинаковым ядерным генотипом (линии дикого типа

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 21-14-00090).

© О. Д. Шишкина, М. А. Дерюженко, О. В. Андреенкова, М. А. Бобровских, Н. В. Шацкая, Г. В. Васильев, А. И. Клименко, А. Е. Коренская, Н. Е. Грунтенко, 2024

Bi90), но с различным инфекционным статусом. Экспериментальная модель включала линию $Bi90^{T}$ (линия утратила инфекцию под действием антибиотика тетрациклин), $Bi90^{wMelCS\ 1\ 1,2}$ (инфицирована штаммом $wMelCS^{1\ 1,2}$) и $Bi90^{wMelPlus}$ (инфицирована штаммом wMelPlus) (см. таблицу). Были выделены функциональные группы генов, которые относятся к ответу на инфекцию разными штаммами вольбахии. Детально была рассмотрена группа ДЭГов, относящихся к ответу на стресс. Основываясь на полученных результатах, выдвинуто предположение, что стрессоустойчивый фенотип *D. melanogaster*, вызываемый штаммом wMelPlus, связан с изменениями в активности гена коразонинового рецептора (*CrzR*)[2].

Линии *Drosophila melanogaster* и штаммы *Wolbachia*, использованные в работе

Линия *D. melanogaster*	**Штамм *Wolbachia***	Происхождение линии — источника штамма
$Bi90^{T}$	–	Бишкек, Кыргызстан, 2004
$Bi90^{wMelCS\ 1\ 1,2}$	$wMelCS^{1\ 1,2}$	Bloomington, USA, 2010
$Bi90^{wMelPlus}$	wMelPlus	Ташкент, Узбекистан, 1989

Литература

1. Korenskaia A. E. et al. New *Wolbachia pipientis* Genotype Increasing Heat Stress Resistance of *Drosophila melanogaster* Host Is Characterized by a Large Chromosomal Inversion // Intern. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 24. P. 16212.

2. Gruntenko N. E. et al. *Drosophila melanogaster* Transcriptome Response to Different *Wolbachia* Strains // Intern. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24, No. 24. P. 17411.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-284

ПОИСК ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ И ПЕРЕКРЕСТНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) В ОТВЕТ НА ХОЛОД И ЗАСУХУ НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА [*]

IDENTIFICATION OF COLD AND DROUGHT RESISTANCE GENES AND CROSS-REGULATION MECHANISMS IN TEA (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) BASED ON TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS

Р. М. Шхалахова, В. И. Маляровская

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр РАН», Сочи

R. M. Shkhalakhova, V. I. Malyarovskaya

Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre RAS, Sochi

✉ shhalahova1995@mail.ru

Аннотация

В данной работе мы провели транскриптомный анализ растений чая в условиях абиотических стрессов (холод-засуха). Определены основные общие механизмы ответа на холод и засуху, а также потенциальные гены-кандидаты для селекции, направленной на устойчивость чая к комплексу данных факторов.

Abstract

In this work, we investigated transcriptomic analysis of tea plants under abiotic stress conditions (cold and drought). The main general mechanisms of response to cold and drought were identified, as well as potential candidate genes for selection aimed at improving tea resistance to this complex of factors.

Среди древесных культур чайное растение (*Camellia sinensis* L.) является одной из важнейших товарных культур в мире. В большинстве стран — производителей чая плантации страдают от засухи и холодного стресса, которые значительно снижают урожайность и уменьшают распространение урожая в более холодных районах. Холод и засуха индуцируют общие и специфические наборы сигнальных путей и регуляторных механизмов вслед за биохимическими реакциями, влияющими на фенотип растений [1]. Поэтому необходимо лучше понять перекрестные генетические механизмы для создания сортов, толерантных к нескольким факторам окружающей среды, которые могут способствовать повышению продуктивности сельскохозяйственных культур в условиях меняющегося климата во всем мире [2]. Коллекция зародышевой плазмы чая Северного Кавказа находится на границе возможного мирового производства чая, некоторые генотипы коллекции способны выживать при температуре ниже −20 °C.

Целью работы являлось выявление перекрестных и специфичных ответов чая на холод и засуху, проявляющихся при моделировании стресса на основе транскриптомных данных.

В качестве материала были использованы растения элитного местного сорта чая Колхида (температура выживания взрослых растений около −10–12 °C) (ФИЦ СНЦ РАН, Сочи, Россия). Для индукции холода растения помещали в холодовые камеры с температурой +2–4°. Отборы образцов при индукции холодового стресса проводили по схеме: 0 ч — контроль, 1, 3, 12 ч — кратковременный стресс, 7 дней (д), 14 д — долговременный стресс, восстановление 7 д. При индукции засухи: контроль, засуха 1, 3, 6, 9 д, восстановление 4 д.

RNAseq и анализ транскриптомов в отобранных образцах проводили по протоколу Illumina, обработка и анализ данных RNAseq и валидация методом qRT-PCR — на базе ФИЦ СНЦ РАН. Сборка транскриптомов *de novo* с программой Trinity, функциональная аннотация — с использованием баз данных NR, Swiss-Prot, GO, KEGG и COG. Далее проводили анализ дифференциальной экспрессии генов, GO-анализ главных компонент, анализ коэкспрессии и реконструкцию генных сетей

Анализ показал, что общие термины GO, связанные с тилакоидными мембранами, фотосинтетическими мембранами, реакцией на каррикин, транспортом электронов, цитохромным комплексом, играют жизненно важную роль в ответах чая на длительную засуху и холод. Кроме этого, 20 транскрипционных факторов, большинство из которых связаны с АБК-опосредованным путем ответа, повышенно экспрессировались в обоих вариантах стрессах.

[*] Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 18-76-10001).

© Р. М. Шхалахова, В. И. Маляровская, 2024

Для реконструкции генных сетей были выбраны гены, связанные с тремя основными путями GO и KEGG: фотоперцепцией, передачей стрессовых сигналов и ремоделированием клеточной стенки, так как по данным RNAseq эти гены повышено экспрессировались при долгом воздействии холода и засухи. В генной сети выявлен центральный функциональный кластер из 19 генов с наивысшей коэкспрессией: 7 генов ремоделирования и биосинтеза клеточной стенки, 4 гена Ca^{2+}-сигналинга, 3 гена фоторецепции, 2 гена гормональной передачи сигналов, 2 гена передачи сигналов АФК и ген фенилпропаноидного пути. Кластер также содержал 41 из 79 наиболее значимых ребер, что указывает на существование совместной регуляции этой основной подсети. Также выделено четыре концентратора, содержащих 6 наиболее значимых соседей: GIL1, Strap, CRT, CXE11. Также 5 генов из этого кластера характеризуются наивысшей степенью экспрессии во всей сети: PXL1, PRP-F1, GATL7, CIPK6, UEL-1. Эти гены являются новыми генами-кандидатами для селекции, направленной на устойчивость чая к холоду и засухе.

В результате установлены основные перекрестные механизмы ответа на холод и засуху: а) ремоделирование клеточной стенки посредством биосинтеза лигнина, о-ацетилирования полисахаридов, биосинтеза и ветвления пектина, биосинтеза ксилоглюкана и арабиногалактана; б) стабилизация липидов при длительном стрессовом ответе чайного растения; в) активация нескольких важных генов фотоперцепции (CRY1, ELIP1, FTIP1, EID1, ERDJ3B, dnaJ11). Исследование представляет новые данные о перекрывающихся и специфических регуляторных путях, ключевых функциональных генах и компонентах сигнальной трансдукции, участвующих в краткосрочных и долгосрочных холодах, засухе чая.

Литература

1. Zhou R., Yu X., Zhao T. et al. Physiological analysis and transcriptome sequencing reveal the effects of combined cold and drought on tomato leaf // BMC Plant Biol. 2019. Vol. 19. P. 377.

2. Minhas P. S., Rane J., Pasala R. K. Abiotic stress management for resilient agriculture. Springer, 2017.

РАЗДЕЛ VI

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-285

CHOLESTEROL-CONJUGATED SMALL INTERFERING RNA TARGETING *IL6* ALLEVIATES ACUTE LUNG INJURY IN MICE *

I. K. Bachkova[1,2], I. V. Chernikov[1], A. V. Sen'kova[1], M. I. Meschaninova[1], I. A. Savin[1], V. V. Vlassov[1], M. A. Zenkova[1], E. L. Chernolovskaya[1]

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

✉ i.bachkova@g.nsu.ru

Abstract

Inflammatory diseases affect a substantial portion of the global population, and the current treatment is not universally effective. We demonstrate that locally administered cholesterol-conjugated siRNA targeting *Il6* alleviates the symptoms of acute lung injury, which makes it a promising strategy for the treatment of inflammatory diseases with potential applications beyond the lungs.

Inflammatory diseases affect 5–9 % of the global population, with their incidence increasing annually. The existing treatment is not effective for all patients and is often accompanied by side effects. Small interfering RNAs (siRNAs) sequence-specifically silence genes at the post-transcriptional level, representing a novel therapeutic modality. While their clinical application is currently limited to liver diseases, methods for targeting extrahepatic tissues with siRNA are advancing, with promising results achieved by conjugating siRNAs to lipophilic molecules. The lung is an attractive organ for siRNA delivery since it allows for local administration and has relatively low nuclease activity. Acute lung injury (ALI), a severe inflammatory condition, is characterized by damage to the vascular endothelium and alveolar epithelium, which leads to interstitial and pulmonary edema and, ultimately, alveolar collapse. Interleukin-6 (*Il6*) is one of the key regulators of inflammatory processes, and a reduction in *Il6* levels is associated with the alleviation of ALI symptoms. Thus, in this study, we designed a cholesterol conjugate of anti-*Il6* siRNA to reduce ALI manifestations.

First, we screened nine sequences of anti-*Il6* siRNAs selectively modified with 2'OMe in J774 murine macrophage cells. Four of the nine siRNAs transfected with Lipofectamine 2000 were inactive; other four reduced *Il6* mRNA to 50 %, and the best one reduced *Il6* mRNA to 35 %. The latter sequence was further modified with 2'OMe, 2'F, and phosphorothioate (PS) modifications for increased nuclease resistance and conjugated to cholesterol to allow for *in vivo* delivery.

The siRNA was administered intranasally to BALB/c mice. Four days later, LPS was administered intranasally to induce ALI. Six hours post-induction, mice were sacrificed, and *Il6* mRNA levels in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid cells, as well as pro-inflammatory parameters in BAL fluid and lung tissue, were analyzed. The siRNA administered at doses of 2,1, 4,2, and 8,5 μg/g decreased *Il6* mRNA levels in BAL fluid cells by 30, 78 and 71 %, respectively, and the number of total leukocytes in BAL fluid by 1,9, 2,7, and 5-fold compared to the untreated control, respectively. The differential leukocyte count showed the reduction of inflammation-associated granulocyte recruitment, particularly at a dose of 8,5 μg/g. Histological study of the lung tissue demonstrated a 2,2- and 3,2-fold decrease in inflammatory infiltration intensity in the 4,2 and 8,5 μg/g groups. These groups also showed a 1,4- and 1,6-fold decrease in the volume density of alveolar septa compared to the untreated control, thus almost matching the levels observed in healthy mice.

In conclusion, we demonstrate the effective reduction of inflammation by cholesterol-conjugated anti-*Il6* siRNA. The present study was conducted using the ALI model, but our findings may aid in developing novel strategies to treat other inflammatory conditions, including but not limited to rheumatoid arthritis, psoriasis, inflammatory bowel disease, and sepsis.

* The study was supported by the RSF grant № 19-74-30011.

© I. K. Bachkova, I. V. Chernikov, A. V. Sen'kova, M. I. Meschaninova, I. A. Savin, V. V. Vlassov, M. A. Zenkova, E. L. Chernolovskaya, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-286

INFLUENCE OF THE BACTERIAL PIGMENT PRODIGIOSIN ON THE CYTOSKELETON OF CANCER AND NORMAL CELL LINES *

A.A. Danilushkina, I.D. Guryanov, F.S. Akhatova, E.A. Naumenko

Kazan Federal University

✉ ekaterina.naumenko@gmail.com

Abstract

Cancer cells are known for their uncontrolled growth and ability to invade surrounding tissues. One promising area of research in cancer treatment is the use of the pigment prodigiosin, produced by the bacteria *Serratia marcescens*, due to its selective effect. In our work, we showed that prodigiosin at a concentration of 1–5 μg/ml disrupts the cytoskeleton of cancer cells without affecting normal cells.

In recent years, there has been an increase in research in the field of practical application of prodigiosin (PG), mainly devoted to its production, as well as its antimicrobial and anticancer potential. PG has some advantages in the biomedical field, for example, the selective activity against cancer cells was identified recently, but exact mechanism of this phenomenon remains unclear. The therapeutic use of PG requires systematic preclinical and clinical studies. It is known about a number of clinical trials of the anticancer drug obatoclax, which is a derivative of PG. Several phase II clinical studies have been completed examining the use of obatoclax in the treatment of leukemia, lymphoma, myelofibrosis and mastocytosis. Currently, there are no clinical trials being conducted, but there has been a growing interest among researchers in studying the various therapeutic properties of PG. One of the possible mechanisms of the selective action of PG on cancer cells is damage to the cytoskeletal elements in these cells, which have a higher proliferation rate compared to surrounding normal cells.

In our work, we used a simple method for modeling the microenvironment of a cancer tumor by forming a mixed culture based on a human hepatoma cell line (HepG2) and fibroblasts (HSF). Co-cultivation of the cells continued until a complete monolayer was achieved and clear, visually distinguishable islets of cancer cells surrounded by fibroblasts were formed. Additionally, HepG2 cells were labeled with the membrane dye Dil. Prodigiosin was added in DMSO solution to a final concentration of 1, 2,5 and 5 μg/ml. After 24–48 h of incubation, cell viability was studied using the LIVE/DEAD double staining method and the cytoskeleton was visualized using FITC-conjugated phalloidin. Using fluorescence microscopy, it was revealed that even at a concentration of 1 μg/ml, the cytoskeleton structure in HepG2 cells was disrupted, while in fibroblasts it retained its native structure. At the same time, this concentration had virtually no effect on the viability of both normal and malignant cells. At a concentration of 2,5 and 5 μg/ml, 70–90 % of HepG2 cells died and the cytoskeleton of the remaining cells in the monolayer was fragmented. Fibroblasts retained their morphology and cytoskeleton structure, but at a concentration of 5 μg/ml, the number of viable fibroblasts decreased to 50 %. Prodigiosin lead to disorganization of the nucleus structurecas well as vacuolization and reducing the cytoplasm volume in HepG2 cells. At the same time HSF nuclei remain normal morphology, while slight vacuolization observed. Thus, vitro anticancer effects of PG were manifested in the suppression of HepG2 cells proliferation, followed by alteration of cell morphology and F-actin structure disorganization.

The ability of prodigiosin to impact the cytoskeleton in cancer cells without affecting normal cells holds great promise for cancer treatment. By specifically targeting the cytoskeleton, prodigiosin could serve as a novel therapeutic approach for inhibiting cancer cell growth and metastasis. Furthermore, the selectivity of prodigiosin for cancer cells could reduce the side effects commonly associated with traditional cancer treatments. In conclusion, prodigiosin's unique mechanism of action in targeting the cytoskeleton of cancer cells while sparing normal cells represents a significant advancement in cancer research. By understanding how prodigiosin affects the cytoskeleton and its differential impact on cancer cells and normal cells, researchers can explore new avenues for developing more effective and targeted cancer treatments.

* The work was supported by the RSF grant № 23-25-00334.

© A.A. Danilushkina, I.D. Guryanov, F.S. Akhatova, E.A. Naumenko, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-287

DKK3 SECRETED BY MESENCHYMAL STROMAL CELLS PREVENTS FIBROBLAST-TO-MYOFIBROBLAST TRANSITION *

M.A. Kulebyakina[1,2], D.A. Butuzova[1], N.A. Basalova[1,2], A.Yu. Efimenko[1,2]

[1]Faculty of Fundamental Medicine, Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University
[2]Center for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University

✉ coolebyakina@gmail.com

Abstract

It is well known that mesenchymal stromal cells (MSCs) prevent the development of fibrosis in a paracrine manner; still, the underlying mechanisms have not yet been studied. Using proteomic analysis, we identified the DKK3 protein, a regulator of the Wnt signaling pathway, in the MSC secretome. We also demonstrated that the DKK3 protein in the MSC secretome suppresses the canonical Wnt signaling pathway in fibroblasts and prevents myofibroblast differentiation.

Mesenchymal multipotent stem cells (MSCs) regulate tissue renewal and regeneration in a paracrine manner. In humans, the formation of a scar, or fibrous tissue, is the prevailing outcome of healing of damaged tissue. Fibrous tissue is formed by myofibroblasts which originate predominately from resident tissue fibroblasts under the influence of profibrotic stimuli. Dysregulation of fibroblast-to-myofibroblast differentiation can lead to fibrosis, a pathological condition where healthy functional tissue is excessively replaced by scar tissue. We have recently shown that soluble proteins secreted by MSCs prevent the fibroblasts-to-myofibroblasts transition [1, 2], but the mechanisms of this have not yet been studied.

Here, we isolated a fraction of soluble proteins from the total secretome of MSCs and studied its protein contents using semi-quantitative proteomic analysis. We found that soluble proteins secreted by MSCs are enriched in proteins capable of regulating fibroblasts-to-myofibroblasts transition through interaction with TGF-β, Wnt and Notch canonical signaling pathways. Using real-time PCR, we showed that the soluble proteins fraction of MSCs secretome desreases the basal expression level of the *AXIN2* gene, a transcriptional target of the canonical Wnt signaling pathway, but does not alter expression levels of TGF-β and Notch transcriptional targets in fibroblasts at the early stages (6 hours) in the model of fibroblasts-to-myofibroblasts transition. We demonstrated by Western blotting that the soluble proteins fraction of MSCs secretome reduces fibroblasts nuclear content of beta-catenin, a canonical Wnt signaling pathway mediator, in a model of fibroblasts-to-myofibroblasts transition. According to our proteomic analysis results, among proteins abundant in the soluble proteins fraction of MSCs secretome there is DKK3 protein. Literature data suggest that DKK3 can downregulate canonical Wnt signaling pathway in target cells [3, 4]. We depleted DKK3 protein from the soluble proteins fraction of MSCs secretome by immunoprecipitation method. We found that depletion of the DKK3 dramatically reduces the ability of the soluble proteins fraction of MSCs secretome to reduce the level of expression of the *AXIN2* gene in fibroblasts in a model fibroblasts-to-myofibroblasts transition, and also diminihes its ability to effectively prevent the fibroblasts-to-myofibroblasts transition. The data obtained reveal mechanisms of MSCs paracrine effects on the fibroblasts-to-myofibroblasts transition as well as pave the way for the development of potential antifibrotic drugs based on the MSCs secretome.

References

1. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., Evtushenko E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Efimenko A. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles // Cells. 2020. Vol. 9(5). P. 1272.

2. Kulebyakina M., Basalova N., Butuzova D., Arbatsky M., Chechekhin V., Kalinina N., Efimenko A. Balance between Pro- and Antifibrotic Proteins in Mesenchymal Stromal Cell Secretome Fractions Revealed by Proteome and Cell Subpopulation Analysis // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 25(1). P. 290.

3. Zhai C.G., Xu Y.Y., Tie Y.Y., Zhang Y., Chen W.Q., Ji X.P., ... & Zhang C. DKK3 overexpression attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in an angiotensin-perfused animal model by regulating the ADAM17/ACE2 and GSK-3β/β-catenin pathways // Journal of molecular and cellular cardiology. 2018. Vol. 114. P. 243–252.

4. Onai T., Takai A., Setiamarga D.H., Holland L.Z. Essential role of Dkk3 for head formation by inhibiting Wnt/β-catenin and Nodal/Vg1 signaling pathways in the basal chordate amphioxus // Evolution & development. 2012. Vol. 14(4). P. 338–350.

* The study was supported by RSF (project № 19-75-30007).

© M.A. Kulebyakina, D.A. Butuzova, N.A. Basalova, A.Yu. Efimenko, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-288

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF SYNAPTAMIDE IN TRAUMATIC BRAIN INJURY

I. V. Manzhulo, A. A. Tyrtyshnaia, A. A. Egoraeva, D. N. Ivashkevich, O. S. Manzhulo, A. I. Ponomarenko

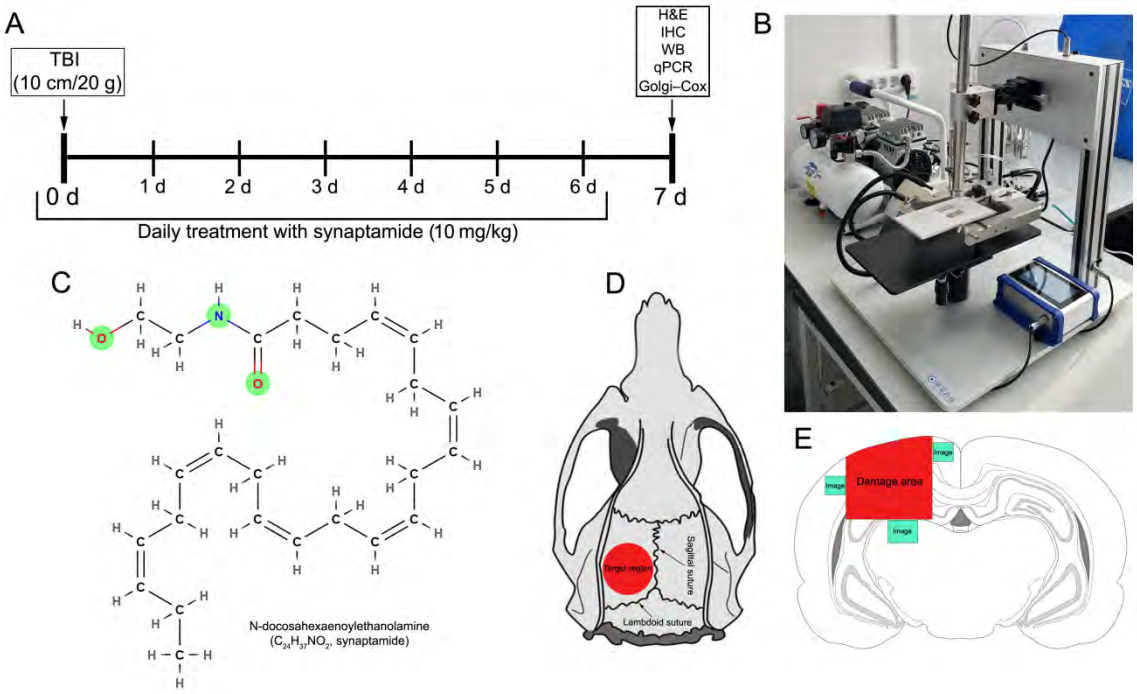
Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok

✉ arina.ponomarenko.93@mail.ru

Abstract

Traumatic brain injuries (TBI) of varying severity are becoming more frequent all over the world. The process of neuroinflammation, in which macrophages and microglia are key players, underlies all types of brain damage [1]. The present study focuses on evaluating the anti-inflammatory potential of N-docosahexaenoylethanolamine (DHEA, synaptamide) in TBI.

All experimental procedures were performed on male C57BL/6 mice (3 months old, 26–28 g). Synaptamide (99,4 % purity) used in the present study was obtained from the digestive gland of *Berryteuthis magister* at the Pharmacology Laboratory of the NSCMB FEB RAS (see Figure, *C*). In the present study, the weight drop induced (WDI) cortical injury model (see Figure, *D*), previously developed by Feeney et al., 1981 [2], and was used to generate TBI. The model was generated using a specialized IMP-1020 impactor (Shanghai TOW Intelligent Technology, Shanghai, China) (see Figure, *B*). Synaptamide in a dose of 10 mg/kg and vehicle was injected subcutaneously in a volume of 100 µl, daily for 7 days from the day of surgery (see Figure, *A*). Material from for western blot, qPCR, histological and immunohistochemical studies was obtained after 7 days postoperatively. Images of the cortex and thalamus were acquired on a Zeiss Axio Imager microscope using an AxioCam 503 camera and AxioVision software (Zeiss, Muenster, Germany) (see Figure, *E*). Immunopositive staining was counted using ImageJ NIH (Bethesda, MD, USA). The present study examined the dynamics of changes in the activity of Iba-1- and CD68-positive microglia/macrophages, the level of production of pro-inflammatory cytokines (IL1β, IL6, TNFα) and pro-apoptotic proteins (Bad, Bax), the expression



(A) Experiment overall design; (B) Image of the IMP-1020 impactor; (C) Chemical structure of N-docosahexaenoylethanolamine (DHEA, synaptamide); (D) Anatomical mapping of the craniotomy and the target area for the rod force. The red dot indicates the site of force application. Institutional animal care committee approval was obtained for all experiments; (E) Green marks the ipsilateral thalamus and cortical regions that were subjected to immunohistochemistry examination. The area of the damage (marked in red)

© I. V. Manzhulo, A. A. Tyrtyshnaia, A. A. Egoraeva, D. N. Ivashkevich, O. S. Manzhulo, A. I. Ponomarenko, 2024

of pro- and anti-inflammatory markers (CD68, CD206, arg-1). ATF3 transcription factor distribution and neuronal state in the thalamus and cerebral cortex of animals with sham injury, traumatic brain injury, and therapy are quantitatively assessed.

The obtained data showed that synaptamide: (1) has no effect on the total pool of microglia/macrophages; (2) inhibits the activity of pro-inflammatory microglia/macrophages and cytokines they produce; (3) increases the expression of CD206 but not arg-1; (4) has anti-apoptotic effect and (5) improves the morphological state of neurons. In conclusion, given that the pathological process seen following TBI involves excitotoxicity, apoptosis, and oxidative stress due to the development of uncontrolled neuroinflammation, the use of synaptamide as an immunomodulatory medication is fully justified.

References

1. Chiu C., Liao Y., Yang L., Wang J., Tweedie D., Karnati H. Greig, N. Wang J. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury // Journal of Neuroscience Methods. 2016. Vol. 272. P. 38–49.

2. Feeney D. M., Boyeson M. G., Linn R. T., Murray H. M., Dail W. G. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat // Brain Research. 1981. Vol. 211. P. 67–77.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-289

TOXICITY ASSESSMENT OF IRON OXIDE NANOCOMPOSITE

M.A. Novikov

East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research, Angarsk

✉ novik-imt@mail.ru

Abstract

Subacute oral administration of a solution containing iron oxide nanoparticles Fe_3O_4 with the addition of a nanostabilizing matrix of natural origin — arabinogalactan — was performed to outbred male rats. The number of neurons per unit area, astroglial cells, degeneratively altered neurons and the number of neuronophagy acts were counted in sections of nervous tissue. The number of Kupffer stellate macrophages and the number of polynuclear hepatocytes were counted in liver sections. The area of the Shumlyansky-Bowman chamber was determined in kidney tissue. As a result, changes characterized as compensatory-adaptive reactions were observed in liver and brain tissues, and signs of organ dysfunction were observed in kidney tissue.

Introduction

It is known that the use of metal oxide nanoparticles is limited by their potential toxicity [1]. The toxicity of oxide nanoparticles can be reduced by using high-molecular compounds, such as arabinogalactan (AG) of Siberian larch [2]. The use of iron oxide nanoparticles encapsulated in an arabinogalactan matrix increases the bioavailability of nanoparticles and reduces the potential toxicity of drugs, but a comprehensive study of their safety is necessary.

Materials and Methods

The investigation was carried out on 30 outbred white male rats weighing 200–220 g. The animals were divided into 2 groups: experimental (EXP, n = 15), which were intragastrically administered 1 ml of an aqueous solution of Fe_3O_4AG at a dose of 500 μg/kg using an atraumatic probe for 10 days, and control (CONT, n = 15). In prepared and stained histological sections of the brain, kidneys and liver, morphometric parameters specific to each organ were calculated.

Results and Discussion

The results of the nervous tissue study showed a marked decrease in the total number of normal neurons per unit area compared to the control. The number of astroglial cells in the experimental group was also reduced compared to the control group (at the trend level, p = 0.05). At the same time, the number of degeneratively altered neurons (darkly colored neurons without a clearly separable nucleus and cytoplasm were considered degeneratively altered) did not have a statistically significant difference from the control. The number of acts of neuronophagy also did not differ from the control group (Table 1).

Table 1

Morphometric indices of the sensorimotor cortex tissue of the brain of white rats under subacute influence of Fe_3O_4AG (Me (Q25–Q75))

Indicators	EXP	CONT	p
Number of normal neurons per unit area (0,2 mm^2)	171,0 (170,0–177,0)*	201,0 (199,0–207,0)	0,001
Number of astroglial cells per unit area (0,2 mm^2)	163,5 (151,0–183,0)	184,0 (178,0–197,0)	0,050
The number of degeneratively altered neurons per unit area (0,2 mm^2)	3,5 (1,0–6,0)	1,0 (1,0–2,0)	0,193
Number of neuronophagy facts	1,5 (0,0–3,0)	0,0 (0,0–0,0)	0,073

* Differences are statistically significant compared to CONT according to the Mann — Whitney test, p < 0,05.

The number of Kupffer stellate macrophages in the liver sinusoidal capillaries did not differ compared to the control group. The number of polynuclear hepatocytes also did not differ statistically significantly from the control group (Table 2).

Table 2

Morphometric indices of liver tissue of white rats under subacute influence of Fe_3O_4AG (Me (Q25–Q75))

Indicators	EXP	CONT	p
Kupffer stellate macrophage count	115,0 (101,0–134,0)	106,0 (103,0–110,0)	0,58
Number of polynuclear hepatocytes	12,5 (11,0–17,0)	13,0 (8,0–15,0)	0,67

© M.A. Novikov, 2024

In the renal cortex, a statistically significant increase in the area of the Shumlyansky-Bowman capsule was observed compared to the control group (Table 3).

Table 3

Morphometric indices of changes in the area of the Shumlyansky-Bowman capsule in the renal cortex of white rats under subacute exposure to Fe_3O_4AG (Me (Q25–Q75))

Indicator	EXP	CONT	p
Shumlyansky-Bowman capsule area	24676,9 (23657,4–29280,0)*	20741,8 (16801,9–29346,3)	0,018

Thus, the effect of Fe3O4AG on the body of white rats is characterized by the development of morphofunctional changes in various body systems. The nature and intensity of changes in the liver and brain tissue suggest the development of compensatory-adaptive reactions in the body in response to the effect of the iron nanocomposite. However, the effect of the studied nanocomposite on the kidneys led to an increase in the area of the Shumlyansky-Bowman capsule, which may result in a violation of the normal filtration coefficient of the renal glomeruli and, as a consequence, a violation of the normal functioning of the organ, which is a more serious violation. Further studies of this nanocomposite in different doses and routes of administration are needed.

References

1. Mao Z., Li X., Wang P., Yan H. Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: an update patent review. Expert Opinion on Therapeutic Patents. 2022. 32 (9). P. 939–952.

2. Novikov M.A., Titov E.A., Sosedova L.M., Rukavishnikov V.S., Vokina V.A., Lakhman O.L. Comparative assessment of silver nanocomposites' biological effects on the natural and synthetic matrix // International Journal of Molecular Sciences. 2021. 22 (24). https://doi.org/10.3390/ijms222413257.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-290

THE IMPACT OF MANGIFERIN AND TRANS-CINNAMIC ACID ON THE SURVIVAL AND LIFESPAN OF WILD TYPE N2 BRISTOL AND AAK-2 *CAENORHABDITIS ELEGANS* MUTANT STRAINS UNDER OXIDATIVE STRESS *

S. S. Salimon[1], E. I. Marusich[2], S. V. Leonov[2,3]

[1] *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2] *Institute of Future Biophysics, Dolgoprudny*
[3] *Institute of Cell Biophysics RAS, Moscow*

✉ salimon.s@phystech.edu

Abstract

Reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) are generated during cellular metabolism. These ROS and RNS, in turn, cause oxidative damage to DNA and proteins. As a survival mechanism, these stressors modulate gene expression and various signalling pathways in *Caenorhabditis elegans* [1]. Furthermore, it has been demonstrated that environmental changes have an impact on lifespan and health span [2]. The ability of humans and animals to remain viable under different environmental conditions is called stress tolerance, wherein the resistance to multiple types of stress peaks during early adulthood and then declines with age [3]. AAK-2, an AMP-activated protein kinase isoform in *C. elegans*, has a role in stress responses, germ cell cycle arrest following dauer formation, and maintenance of life span [4].

In this study, we evaluated the effect of mangiferin and trans-cinnamic acid (at 10, 50, 100 and 200 µM) on percentage survival ratio and lifespan of hydrogen peroxide-treated *C. elegans* in a well-known *in vivo* model of resistance to oxidative stress. The nematodes (wild-type N2 Bristol and AAK-2 mutant strains) were exposed to 3 % H_2O_2 corresponding to 1:10 v/v for 2 hours. Thereafter, the H_2O_2-stressed nematodes were observed using ZEISS LSM 900 Confocal Microscope for the computation of % survival ratio and continued to be monitored until the last nematode alive (maximum lifespan).

The treatment of oxidatively challenged wild-type N2 *C. elegans* with trans-cinnamic acid at 50, 100 and 200 µM significantly ($p < 0,05$) increased the survival ratio and maximum lifespan of the nematodes compared to the control (Table 1). Furthermore, mangiferin at all doses investigated significantly ($p < 0,05$) improved the survival ratio and extended the lifespan of H_2O_2-stressed N2 nematodes (see Table 1).

H_2O_2-treated AAK-2 mutant strains demonstrated a dose-dependent increase in survival ratio and lifespan following the administration of mangiferin and trans-cinnamic acid (Table 2). The 200 µM of mangiferin was particularly commendable as it improved the survival ratio from 5 % in the control group to 52 %, and lifespan from 2 — 118 hours (see Table 2).

Our findings suggests that trans-cinnamic acid and more importantly, mangiferin markedly enhanced lifespan and stress tolerance in *in vivo* model of hydrogen peroxide-treated *C. elegans*. These beneficial effects highlight the potential of using them in combating oxidative stress-related diseases and aging.

Table 1

Effect of trans-cinnamic acid and mangiferin on 3 % H_2O_2-treated N2 wild-type *C. elegans*

Group	Dose (µmoL)	Number of nematodes	Survival ratio (%)	Maximum lifespan (hrs)
Control		21,40 ± 1,05 [a]	2,75	2,00 ± 0,51 [a]
Trans-cinnamic acid	10	21,80 ± 2,77 [a]	3,82	2,50 ± 0,20 [a]
	50	19,80 ± 0,09 [a]	15,79	3,50 ± 0,46 [b]
	100	16,80 ± 2,33 [b]	13,65	3,25 ± 0,11 [b]
	200	27,80 ± 2,05 [c]	16,66	3,30 ± 0,38 [b]
Mangiferin	10	22,20 ± 1,97 [a]	15,41	7,25 ± 0,44 [c]
	50	18,40 ± 1,10 [b]	14,95	8,10 ± 0,98 [c]
	100	21,50 ± 0,83 [a]	17,83	8,97 ± 0,52 [c]
	200	20,00 ± 1,22 [a]	28,67	68,20 ± 5,67 [d]

Values are means ± standard error of means for 5 replicates, $p < 0.05$. Values with the same superscript implies the absence of a statistically significant difference.

* This research was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the RF (State Task) № 075-03-2024-117, project № FSMG-2023-0015.

© S. S. Salimon, E. I. Marusich, S. V. Leonov, 2024

Table 2

Effect of trans-cinnamic acid and mangiferin on 3 % H_2O_2-treated AAK-2 *C. elegans* mutant strain

Group	Dose (μmoL)	Number of nematodes	Survival ratio (%)	Maximum lifespan (hrs)
Control		18,20 ± 0,67 [a]	4,37	2,00 ± 0,30 [a]
Trans-cinnamic acid	10	17,40 ± 2,17 [a]	3,45	2,00 ± 0,01 [a]
	50	16,80 ± 1,02 [a]	3,57	2,50 ± 0,50 [a]
	100	19,40 ± 2,68 [a]	5,15	10,54 ± 0,33 [d]
	200	19,40 ± 3,31 [a]	7,22	12,11 ± 0,48 [e]
Mangiferin	10	16,20 ± 0,43 [a]	4,94	4,59 ± 0,22 [b]
	50	20,20 ± 1,65 [a]	6,93	7,40 ± 0,05 [c]
	100	19,60 ± 2,51 [a]	8,16	12,00 ± 0,11 [e]
	200	16,20 ± 1,37 [a]	51,85	118,30 ± 0,25 [f]

Values are means ± standard error of means for 5 replicates, $p < 0.05$. Values with the same superscript implies the absence of a statistically significant difference.

References

1. Wang J., Deng N., Wang H., Li T., Chen L., Zheng B., Liu R. H. Effects of orange extracts on longevity, healthspan, and stress resistance in *Caenorhabditis elegans* // Molecules. 2020 Vol. 25. P. 351.

2. Banse S. A., Jackson E. G., Sedore C. A., Onken B., Hall D., Coleman-Hulbert A., Huynh P., Garrett T., Johnson E., Harinath G., Inman D. The coupling between healthspan and lifespan in Caenorhabditis depends on complex interactions between compound intervention and genetic background // Aging (Albany NY). 2024. 16 (7). P. 5829.

3. Dues D. J., Andrews E. K., Schaar C. E., Bergsma A. L., Senchuk M. M., Van Raamsdonk J. M. Aging causes decreased resistance to multiple stresses and a failure to activate specific stress response pathways // Aging-US. 2016. Vol. 8 (4). P. 777–795.

4. Lee H., Cho J. S., Lambacher N., Lee J., Lee S. J., Lee T. H, Gartner A., Koo H. S. The *Caenorhabditis elegans* AMP-activated protein kinase AAK-2 is phosphorylated by LKB1 and is required for resistance to oxidative stress and for normal motility and foraging behavior // Journal of Biological Chemistry. 2008. 283(22). P. 14988–14993.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-291

ОПТИМАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ИНФИЦИРОВАННЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* РАН *

SELECTION OF PARAMETERS FOR CREATING A MOUSE MODEL OF INFECTED *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WOUNDS

М. М. Абдулкадиева[1], В. В. Литвиненко[1,2], Д. А. Слонова[1], К. А. Собянин[1,3], Е. В. Сысолятина[1]

[1] *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва*
[2] *Объединенный институт высоких температур РАН, Москва*
[3] *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва*

M. M. Abdulkadieva[1], V. V. Litvinenko[1,2], D. A. Slonova[1], K. A. Sobyanin[1,3], E. V. Sysolyatina[1]

[1] *Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow*
[2] *Joint Institute of High Temperatures RAS, Moscow*
[3] *Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

✉ Maryam094@yandex.ru

Аннотация

Инфицирование ран приводит к удлинению сроков лечения, повышению риска развития сепсиса и инвалидизации. Для тестирования новых антибактериальных и ранозаживляющих средств требуются адекватные *in vivo* модели. Целью данной работы стал подбор оптимальных параметров мышиной модели инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран, в том числе с иммунной супрессией, с учетом массы мышей, заражающей дозы и техники моделирования и ведения ран.

Abstract

Infection of wounds leads to longer treatment periods, increased risk of sepsis and disability. Adequate *in vivo* models are required to test new antibacterial and wound healing agents. The aim of this work was to select the optimal parameters of mouse model of infected *Pseudomonas aeruginosa* wounds with and without immune suppression, such as mass of mice, infectious dose and techniques for modeling and wound management.

Введение

Заживление ран — сложный динамический многофазный процесс восстановления поврежденных тканей. Особой проблемой и финансовым бременем для систем здравоохранения во всем мире являются хронические раны [1, 2]. Переход раны в хроническое состояние часто происходит вследствие контаминации раневой поверхности, что ухудшает качество жизни пациентов, увеличивает риск инвалидизации и смертности. Большую сложность в лечении представляют собой огнестрельные раны, так как все они являются контаминированными, а заживление часто протекает на фоне иммунной супрессии пациента.

Разработка средств для ранозаживления невозможна без адекватных моделей *in vivo*. Целью данной работы был подбор оптимальных параметров мышиной модели инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран, в том числе на фоне иммунной супрессии.

Материалы и методы

Мышам линий BALB/c и C57BL/6, самцы, m = 18–22 г (n = min 10 для каждой группы) в рану вносили *P. aeruginosa* (2943, 21), в дозах 10^6,10^7, 10^8, 10^9 кл/рана. Наблюдение проводили в течение 14 дней после нанесения раны. Обсемененность поверхности ран учитывалась на 1, 2, 3, 4, 5, 7-й день после инфицирования.

Модель иммунной супрессии разрабатывалась на самцах линии BALB/c массой 21–23 г. Циклофосфамид в дозе 500, 1000, 1200, 1500 мкг/мышь вводился перитонеально за 4 дня до формирования ран и инфицирования *P. aeruginosa* 21 в дозе 10^6, 10^7, 10^8 кл/рана.

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 056-00006-24-02.

© М. М. Абдулкадиева, В. В. Литвиненко, Д. А. Слонова, К. А. Собянин, Е. В. Сысолятина, 2024

Моделирование ран

Полнослойные раны (d = 12 мм) наносили перфоратором, после чего на поверхность кожи наклеивали кольца с аналогичным диаметром. В рану вносили бактерии в матриксе из 1 % метилцеллюлозы, отверстие заклеивали медицинским пластырем. Все манипуляции с животными проводили с использованием изофлюранового наркоза.

Микробиологические смывы брали стерильным ватным тампоном, смоченным в физиологическом растворе с последующими высевами на твердый питательный агар BHI (Difco, США). Материал на гистологическое исследование отбирался на 4, 7, 14-й день эксперимента стандартным способом.

Результаты

Использование кольца предотвращало контракцию раны. Заклеивание раневой поверхности приводило к формированию гнойных масс к 3-му дню эксперимента на обеих линиях мышей в 100 % случаев. Оптимальная инфицирующая доза составила 10^8 кл/рана (рис. 1). На мышах линии C57BL/6 выраженность воспалительной реакции и объем гнойных масс были ниже, чем для мышей линии BALB/c.

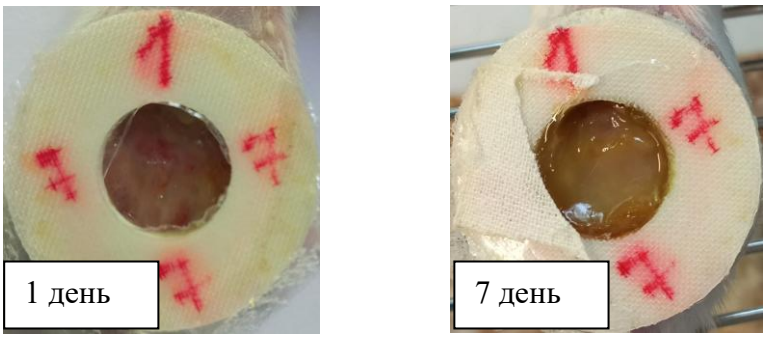


Рис. 1. Фото раны мыши BALB/c с контракционным кольцом

Данные по высевам при инфицирующей дозе 10^8 кл/рана приведены на рис. 2. На второй день после инфицирования наблюдалось 100-кратное увеличение количества бактерий, и затем каждые 24 ч обсемененность снижалась приблизительно на порядок. Высевы на 7-й день проводить было нецелесообразно в связи с образованием плотного струпа.

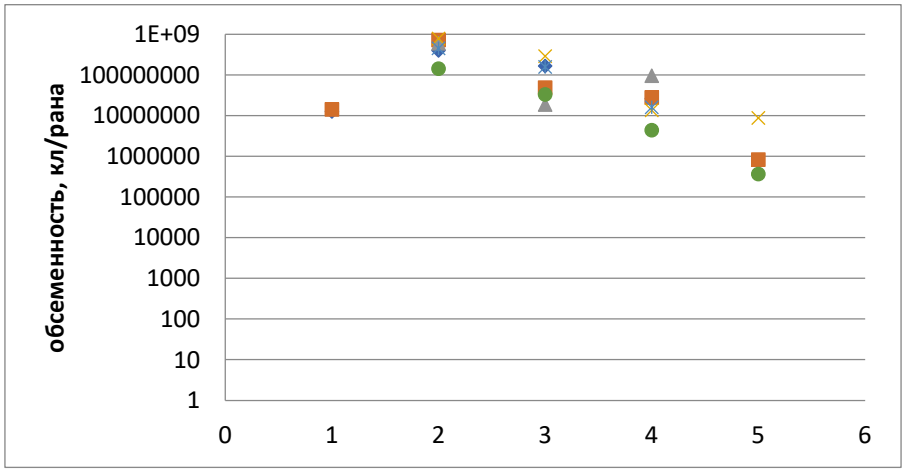


Рис. 2. Обсемененность раневой поверхности мышей линии BALB/c, инфицированных *P. aeruginosa* 21, на 1, 2, 3, 4, 5-й дни эксперимента

Развитие воспаления было подтверждено гистологически — на 4-й день в раневом ложе наблюдались обильные гнойно-некротические массы, под ними — отложения эозинофильной массы и зачатки грануляционной ткани, инфильтрированной лейкоцитами. Подкожная мышца и фасция также были инфильтрированы лейкоцитами. У некоторых животных с краю раневого дефекта были сформированы «карманы», заполненные гнойным экссудатом.

На 7-й день в ране под струпом находились гнойно-некротические массы, но отмечалось активное кровоснабжение грануляционной ткани и инфильтрация ее лейкоцитами, В-клетками и плазмоцитами. Отмечено заполнение дефекта грануляционной тканью, содержащей фибробласты и фиброциты.

Иммунная супрессия со снижением массы тела (в пределах 1,1–2,0 ± 0,3 г), истощением тимуса и селезенки наблюдалась при дозах циклофосфамида ⩾ 1000 мкг/мышь. При использовании инфицирующей дозы *P. aeruginosa* обоих штаммов 10^8 кл/рана на 2-й день после инфицирования наблюдалась 100%-я гибель. Оптимальной дозой для модели инфицированных ран у иммуносупрессированных животных являлась концентрация 10^7 кл/рана при массе животного на момент введения циклофосфамида не ниже 21 г.

Уровень обсемененности раневой поверхности иммуносупрессированных животных был сопоставим с таковым для иммунокомпетентных при различии в инфицирующей дозе в 10 раз. Однако естественное снижение бактериальной нагрузки происходило значительно медленнее: так, на 3-й день эксперимента обсемененность раневой поверхности составила в среднем $1{,}2 \times 10^8$ кл/рана, на 4-й день — $5{,}2 \times 10^7$, на 7-й день плотный струп не формировался, и обсемененность составила $3{,}56 \times 10^7$ кл/рана.

Литература

1. Sen C. K. Human wound and its burden: Updated 2020 compendium of estimates. Adv. Wound Care. 2021; 10:281–292. DOI: 10.1089/wound.2021.0026.

2. Раны и раневые процессы: учеб.-метод. пособие для интернов, ординаторов и врачей / под общ. ред. В. В. Кочубей. Краснодар: ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, 2016. 29 с.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-292

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ NOD2 РЕЦЕПТОРА НА РИСК РАЗВИТИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА

ASSESSMENT OF THE NOD2 RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS IMPACT ON THE RISK OF DEVELOPING ULCERATIVE COLITIS

Э. А. Абубакирова, Д. С. Сташкевич

Челябинский государственный университет

E. A. Abubakirova, D. S. Stashkevich

Chelyabinsk State University

✉ alveera@mail.ru

Аннотация

В настоящей работе оценивалось влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) 2722G>C и 3020insC в гене цитоплазматического рецептора NOD2 на риск развития неспецифического язвенного колита (НЯК). В результате оценки частот распределения аллелей, генотипов и гаплотипов, образованных указанными SNP, авторы заключили, что в популяции русских Челябинской области данные полиморфизмы не ассоциированы с риском развития НЯК.

Abstract

This study assessed the effect of 2722G>C and 3020insC single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the gene of NOD2 cytoplasmic receptor on the risk of ulcerative colitis developing. As a result of assessing the frequencies of alleles, genotypes and haplotypes formed by these SNPs, the authors concluded that these polymorphisms are not associated with the risk of developing ulcerative colitis in the Russian population of the Chelyabinsk region.

Nod-подобные рецепторы — цитоплазматические рецепторы врожденного иммунитета, совместно с Toll-подобными рецепторами распознающие образы патогенов. Объектом настоящего исследования выбран рецептор NOD2 подсемейства NOD, содержащий CARD-домен. Лиганды NOD2: мурамилдипептид, протеогликаны и липополисахариды бактерий, вирусная одноцепочечная РНК. Рецептор NOD2 эпителиоцитов кишечника участвует в поддержании местного гомеостаза за счет усиления барьерной функции эпителия и устойчивости к инвазии патогенов [1].

Нарушение гомеостаза кишечника вследствие анормального иммунного ответа на микробные образы является одним из факторов, приводящих к хроническому воспалению при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК). К данным нарушениям могут приводить однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в генах рецепторов врожденного иммунитета. NOD2 считается основным геном, ассоциированным с предрасположенностью к болезни Крона, а его множественные полиморфизмы связывают с повышенным риском развития заболевания [1, 2]. Однако ассоциация SNP в гене NOD2 с другим ВЗК — неспецифическим язвенным колитом (НЯК) — точно не известна. В зависимости от исследуемой популяции SNP в гене рецептора либо не связаны с восприимчивостью к НЯК, либо различия находятся на уровне тенденции [2].

Наибольший интерес представляют полиморфизмы NOD2, влияющие на богатые лейцином области (LRR-домен) рецептора. Изменения в LRR-домене влияют как на способность распознавания микробных образов, так и на последующую передачу сигналов рецептором. К подобным SNP относятся: 1) замена цитозина на гуанин в положении 2722 (2722G>C, Gly908Arg); 2) инсерция цитозина в положении 3020 (3020insC, Leu1007fsinsC), которая приводит к образованию стоп-кодона и, как следствие, к делеции 33 аминокислот; рецептор вместо мурамилдипептида распознает липополисахарид [1, 3].

Цель настоящего исследования — выявить ассоциацию аллелей, генотипов и гаплотипов, образованных SNP 2722G>C и 3020insC в гене NOD2 с неспецифическим язвенным колитом.

Материалы и методы

Исследуемые группы состояли из 160 лиц с диагностированным НЯК и 128 условно здоровых лиц. По данным генеалогического анамнеза, все обследуемые лица принадлежали к русской этнической группе. Полиморф-

© Э. А. Абубакирова, Д. С. Сташкевич, 2024

ные участки гена NOD2 амплифицировались методом аллель специфической ПЦР (ООО НПФ «Литех», Россия). Продукты амплификации детектировались электрофорезом в 3%-ном агарозном геле с УФ-визуализацией. Для статистической обработки использовались критерий Пирсона (χ^2), критерий χ^2 с поправкой Йетса, точный критерий Фишера. Показатели сцепления гаплотипов рассчитывались в программе «Arlequin ver 3.5». Данные считали статистически значимыми при $p \leqslant 0{,}05$.

Результаты

Распределение частот встречаемости аллелей и генотипов SNP 2722G>C и 3020insC в гене NOD2 показано в таблице. Частоты встречаемости мутантного аллеля C SNP 2722G>C в группе больных НЯК и группе сравнения составили 2,4 и 2,3 %, различия статистически незначимы ($\chi^2 = 0{,}01$; $p = 0{,}921$) (см. таблицу). Статистически значимых различий в частотах распределения генотипов SNP 2722G>C также не обнаружено.

Аналогично частоты встречаемости аллелей и генотипов SNP 3020insC не имели статистически значимых различий (см. таблицу). В процентном соотношении частота гомозиготного по мутантному аллелю генотипа insC/insC выше в группе больных НЯК и составила 1,2 против 0,6 % в группе сравнения ($\chi^2 = 0{,}424$; $p = 0{,}52$).

Распределение частот встречаемости аллелей и генотипов SNP гена NOD2 в исследуемых группах

Аллели/генотипы	Группа больных НЯК	Группа сравнения	Сравнение χ^2, p
	Абс. частота (%)	Абс. частота (%)	
SNP 2722G>C NOD2			
G	320 (97,6)	295 (97,7)	$\chi^2 = 0{,}01$ p = 0,921
C	8 (2,4)	7 (2,3)	
G/G	156 (95,1)	145 (96,0)	$\chi^2 = 0{,}151$ p = 0,70
G/C	8 (4,9)	5 (3,3)	$\chi^2 = 0{,}488$ p = 0,49
C/C	0	1 (0,7)	$\chi^2 = 1{,}09$ p = 0,30
SNP 3020insC NOD2			
–	304 (92,1)	333 (93,0)	$\chi^2 = 0{,}201$ p = 0,66
insC	26 (7,9)	25 (7,0)	
–/–	141 (85,5)	155 (86,6)	$\chi^2 = 0{,}093$ p = 0,76
–/insC	22 (13,3)	23 (12,8)	$\chi^2 = 0{,}018$ p = 0,9
insC/insC	2 (1,2)	1 (0,6)	$\chi^2 = 0{,}424$ p = 0,52

Анализ параметров неравновесного сцепления показал, что предковый аллель G (SNP 2722G>C) сцеплен с мутантным аллелем C (SNP 3020insC) и образует гаплотип 2722*G ~ 3020*C. Частота данного гаплотипа в исследуемых группах составила 8 % в группе больных НЯК и 7 % — в группе сравнения; различия статистически незначимы ($\chi^2 = 0{,}126$; $p = 0{,}72$).

В результате выполненного исследования можно заключить, что однонуклеотидные замены (SNP) 2722G>C и 3020insC в гене NOD2 не ассоциированы с риском развития НЯК в популяции русских Челябинской области.

Литература

1. Trindade B. C., Chen G. Y. NOD1 and NOD2 in inflammatory and infectious diseases // Immunological Reviews. 2020. Vol. 297(1). P. 139–161.

2. Kaczmarek-Rysr M., Hryhorowicz S. T., Lis E., Banasiewicz T., Paszkowski J., Borejsza-Wysocki M., Walkowiak J., Cichy W., Krokowicz P., Czkwianianc E. Crohn's Disease Susceptibility and Onset Are Strongly Related to Three NOD2 Gene Haplotypes // Journal of Clinical Medicine. 2021. Vol. 10. P. 3777.

3. Jaskula E., Lange A., Kyrcz-Krzemien S., Markiewicz M., Dzierzak-Mietla M., Jedrzejczak W. W., Czajka P., Mordak-Domagala M., Lange J., Gronkowska A., Nowak J., Warzocha K., Hellmann A., Kowalczyk J., Drabko K., Gozdzik J., Mizia S.; Polish Donor-Recipient Matching Group. NOD2/CARD15 single nucleotide polymorphism 13 (3020insC) is associated with risk of sepsis and single nucleotide polymorphism 8 (2104C>T) with herpes viruses reactivation in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // Biology of Blood and Marrow Transplantation. 2014. Vol. 20(3). P. 409–14.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-293

ДЕЙСТВИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-LACT И РЕКОМБИНАНТНОГО GMCSF НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНОЙ МОДЕЛИ МЫШИНОЙ ГЛИОМЫ *

ACTION OF THE ONCOLYTIC VIRUS VV-GMCSF-LACT AND RECOMBINANT GMCSF IN AN IMMUNOCOMPETENT MURINE MODEL OF GLIOMA

А. Б. Агеенко[1], Н. С. Васильева[1,2], А. А. Нуштаева[1], А. А. Бывакина[1,3], В. А. Рихтер[1], Е. В. Кулигина[1,2]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *ООО «Онкостар», Новосибирск*
[3] *Новосибирский государственный университет*

A. B. Ageenko[1], N. S. Vasileva[1,2], A. A. Nushtaeva[1], A. A. Byvakina[1,3], V. A. Richter[1], E. V. Kuligina[1,2]

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

✉ a.ageenko@alumni.nsu.ru

Аннотация

При исследовании действия онколитического вируса VV-GMCSF-Lact, в том числе вклада GMCSF в онкотоксическое действие препарата, на модели подкожно трансплантированной глиомы GL-261 мыши наблюдался ярко выраженный иммунный ответ, обусловленный как действием вируса, так и влиянием GMCSF. Охарактеризованы популяции иммунных клеток животных, получавших лечение VV-GMCSF-Lact, rhGMCSF и rmGMCSF, в сравнении с животными контрольных групп.

Abstract

When studying the action of the oncolytic virus VV-GMCSF-Lact, including the contribution of GMCSF to the oncotoxic effect of the drug, a pronounced immune response due to both the action of the virus and the influence of GMCSF was observed on the model of subcutaneously transplanted GL-261 murine glioma. Immune cell populations of animals treated with VV-GMCSF-Lact, rhGMCSF and rmGMCSF were characterized in comparison with animals from the control groups.

Онколитическая виротерапия в настоящее время является одним из перспективных терапевтических подходов для лечения опухолей головного мозга, в том числе глиом, наиболее злокачественных и агрессивных новообразований центральной нервной системы. Помимо прямого лизиса опухолевых клеток, онколитические вирусы способствуют развитию противоопухолевой иммунной реакции, а добавление в геном вируса трансгенов, кодирующих иммуностимулирующие белки, позволяет усилить терапевтическое действие вирусного препарата [1]. Одним из наиболее часто используемых трансгенов является ген гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GMCSF), который способен рекрутировать антигенпрезентирующие клетки в опухоль, тем самым активируя местный противоопухолевый иммунный ответ [2].

VV-GMCSF-Lact — двойной рекомбинантный вирус осповакцины, несет делеции фрагментов генов вирусной тимидинкиназы (*tk*) и ростового фактора (*vgf*), в районы которых встроены гены GMCSF человека и онкотоксического белка лактаптина. Ранее нами была показана впечатляющая противоопухолевая эффективность VV-GMCSF-Lact в отношении ксенографтов глиом человека [3, 4]. Однако для понимания клинических перспектив иммунотерапевтического препарата необходимо исследование его свойств на иммунокомпетентной опухолевой модели. В данной работе исследование противоопухолевой активности VV-GMCSF-Lact, в том числе вклада GMCSF в онкотоксическое действие вируса, проводили на модели глиомы GL-261 мыши, трансплантированной подкожно.

Методом ИФА была проведена оценка уровней экспрессии цитокина GMCSF онколитическим вирусом VV-GMCSF-Lact в клетках различных культур глиом человека и мыши.

При исследовании действия рекомбинантных человеческого (rhGMCSF) и мышиного (rmGMCSF) GMCSF на опухоль наблюдалась сильная иммунная реакция, характеризующаяся некротическим распадом опухолевой ткани и ярко выраженным воспалительным процессом. Действие онколитического вируса VV-GMCSF-Lact

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 24-14-00390).

© А. Б. Агеенко, Н. С. Васильева, А. А. Нуштаева, А. А. Бывакина, В. А. Рихтер, Е. В. Кулигина, 2024

при внутриопухолевом введении сопровождалось схожими процессами, которые, однако, были менее выражены. Методом проточной цитометрии были охарактеризованы популяции иммунных клеток крови, опухоли, селезенки и лимфатических узлов животных, получавших лечение VV-GMCSF-Lact, rhGMCSF и rmGMCSF, в сравнении с животными контрольных групп.

На основании данного эксперимента мы получили подтверждение ключевого вклада иммунной системы как в противоопухолевую эффективность, так и в проявление побочных эффектов вирусного препарата.

Результаты, полученные при оценке действия онколитического вируса VV-GMCSF-Lact на иммунокомпетентной модели глиомы, позволят скорректировать терапевтическую схему применения вирусного препарата (дозы, количество инъекций, интервалы между инъекциями), а также подобрать противовоспалительные препараты-компаньоны для минимизации воспалительных реакций в опухолевой ткани.

Литература

1. Asija S., Chatterjee A., Goda J. S., Yadav S., Chekuri G., Purwar R. Oncolytic immunovirotherapy for high-grade gliomas: A novel and an evolving therapeutic option // Frontiers in Immunology. 2023. Vol. 14. P. 1118246.

2. Chakravarti A. R., Groer C. E., Gong H., Yudistyra V., Forrest M. L., Berkland C. J. Design of a Tumor Binding GMCSF as Intratumoral Immunotherapy of Solid Tumors // Molecular Pharmacology. 2023. Vol. 20. P. 1975–1989.

3. Vasileva N., Ageenko A., Dmitrieva M., Nushtaeva A., Mishinov S., Kochneva G., Richter V., Kuligina E. Double Recombinant Vaccinia Virus: A Candidate Drug against Human Glioblastoma // Life. 2021. Vol. 11(10). P. 1084.

4. Vasileva N., Ageenko A., Byvakina A., Sen'kova A., Kochneva G., Mishinov S., Richter V. Kuligina E. The Recombinant Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact and Chemotherapy Drugs against Human Glioma // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25(8). P. 4244.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-294

ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА СОСТАВ И СТРУКТУРУ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ *

EFFECT OF MULTIPLE DEXAMETHASONE ADMINISTRATION ON THE COMPOSITION AND STRUCTURE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN MOUSE BRAIN TISSUE

С. Д. Аладьев, Д. К. Соколов, А. В. Строкотова, Э. В. Григорьева

Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики, Новосибирск

S. D. Aladev, D. K. Sokolov, A. V. Strokotova, E. V. Grigorieva

Scientific Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk

✉ s.aladev@alumni.nsu.ru

Аннотация

Дексаметазон широко применяется при лечении различных заболеваний, однако длительное его применение имеет побочные эффекты, механизмы которых остаются малоизвестными. В этой работе было изучено влияние многократного отсроченного (15–90 суток) введения дексаметазона на компоненты внеклеточного матрикса нормальной ткани головного мозга. В качестве методов изучения этого эффекта были выбраны: окраска парафиновых срезов альциановым синим с разным pH, ОТ-ПЦР, вестерн-блоттинг и дот-блот. В результате было показано, что дексаметазон оказывал влияние на различные компоненты внеклеточного матрикса в нормальной ткани головного мозга мышей.

Abstract

Dexamethasone is widely used in the treatment of various diseases, but their long-term use has side effects, the mechanisms of which remain little known. In this work we studied the effect of multiple delayed (15–90 days) administration of dexamethasone on the components of the extracellular matrix of normal brain tissue. The following methods were chosen to study this effect: staining of paraffin sections with Alcian blue with different pH, RT-PCR, Western-blotting and dot-blot. As a result, it was shown that dexamethasone had an effect on various components of extracellular matrix in the normal brain tissue of mice.

Дексаметазон (DXM) широко используется в клинике при лечении заболеваний различного генеза, таких как глиобластома, COVID-19, рассеянный склероз и др. DXM обладает противоопухолевым, противовоспалительным, противоаллергическим действиями, однако имеет ряд побочных эффектов. Известно, что действие DXM реализуется через глюкокортикоидный рецептор (GR). Зачастую исследования касаются темы побочных воздействий DXM на различные органы, но до сих пор остается малоизученным его влияние на внеклеточный матрикс (ВКМ) ткани головного мозга мышей. В свою очередь, ВКМ головного мозга является уникальной структурой, поскольку почти не содержит гликопротеины, а преимущественно состоит из гиалуроновой кислоты и сложных молекул протеогликанов (ПГ) [1]. ПГ состоят из корового белка и длинных линейных полисахаридных цепей глигозаминогликанов (ГАГ), имеющих различную степень сульфатирования [2]. ГАГ классифицируют как общие, несульфатированные (гиалуроновая кислота) и высокосульфатированные. К высокосульфатированным ГАГ относят молекулы хондроитинсульфата (ХС) и гепарансульфата (ГС). Несульфатированные ГАГ играют важную роль в поддержании гомеостаза ВКМ, в то время как высокосульфатированные ГАГ отвечают за взаимодействие «клетка — клетка» и «клетка — матрикс», основные сигнальные каскады, структурную организацию ВКМ, а также за функции клеток, такие как адгезия, миграция, пролиферация [3]. Существует довольно мало информации об эффекте DXM на ПГ и ГАГ в нормальной ткани головного мозга. Введение DXM мышам линии C57Bl/6 в течение 7 суток приводит к снижению экспрессии корового белка агрина в коре головного мозга мышей, которые получали DXM [4]. В другой работе было показано влияние DXM на экспрессию некоторых коровых белков ПГ и содержание молекул ГС и ХС в органотипической культуре срезов головного мозга крыс *ex vivo* и экспериментальных животных *in vivo* [5]. Кроме того, в нашей предыдущей работе было показано, что даже однократное введение DXM способно изменять состав и структуру ВКМ [6]. Однако пролонгированные эффекты хронического введения DXM на компоненты ВКМ нормальной ткани головного мозга до сих пор слабо изучены.

Целью этого исследования было изучить влияние многократного (дозировки 1 и 2,5 мг/кг) отсроченного (15–90 суток) введения DXM на экспрессию коровых белков ПГ (15 генов), ферментов биосинтеза ГС (13 генов),

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 21-15-00285).

© С. Д. Аладьев, Д. К. Соколов, А. В. Строкотова, Э. В. Григорьева, 2024

глюкокортикоидного рецептора GR и уровень содержания углеводных цепей ГАГ в нормальной ткани головного мозга мышей.

Мышам линии C57Bl/6 многократно (10 суток) вводили DXM в дозировке 1 и 2,5 мг/кг. Сроки выведения животных из эксперимента составляли 15, 30, 60 и 90 суток. Уровень экспрессии коровых белков ПГ, ферментов биосинтеза ГС и GR оценивали методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровень содержания белка GR оценивали методом вестерн-блот. Уровень содержания общих и высокосульфатированных молекул ГАГ определяли методом окраски альциановым синим с различным pH (pH = 1,0 и pH = 2,5, соответственно). Уровень содержания молекул ХС и ГС оценивали методом дот-блот.

Уровень экспрессии изучаемых коровых белков ПГ (*Syndecan-1, Syndecan-3, Glypican-1, Perlecan, Decorin, Biglycan, Lumican, Brevican, Neurocan, Aggrecan, Versican, NG2, Cspg5, CD44, Ptprz1*) в нормальной ткани головного мозга мышей не изменялся после многократного введения DXM.

Общая транскрипционная активность генов системы биосинтеза ГС (*Ext1, Ext2, Ndst1, Ndst2, Glce, Hs2St1, Hs3St1, Hs3St2, Hs6St1, Hs6St2, Sulf1, Sulf2, Hpse*) повышалась к 15 суткам, временно снижаясь к 30–60 суткам. Кроме того, уровень экспрессии гена *Hs3St2* повышался в 5 раз ($p < 0,05$) к 60 суткам, а уровень экспрессии гена *Hs6St2* повышался в 6 раз ($p < 0,05$) на 30 сутки после введения DXM.

Уровень мРНК и содержание белковой молекулы GR в нормальной ткани головного мозга не изменялись после многократного введения DXM. Однако было решено провести корреляционный анализ для выявления возможной связи экспрессии GR с экспрессией коровых белков ПГ и ферментов биосинтеза ГС. Корреляционный анализ показал, что нормальная ткань головного мозга характеризуется стойкой корреляцией экспрессии GR и 4 из 14 коровых белков ПГ (коэффициент корреляции Спирмена с уровнем GR $r = 0,79–0,94$; $p < 0,05$), а также 7 из 13 ферментов биосинтеза ГС (коэффициент корреляции Спирмена с уровнем GR $r = 0,79–0,91$; $p < 0,05$). Эти данные являются подтверждением участия GR в регуляции транскрипции генов, вовлеченных в биосинтез ПГ.

Уровень содержания углеводных цепей ГАГ изменялся под воздействием многократного введения DXM, а именно: уровень содержания общих ГАГ повышался в 2 раза ($p < 0,05$), достигая максимальных значений на 30 сутки, при этом уровень содержания высокосульфатированных ГАГ в нормальной ткани головного мозга снижался в 1,5–2 раза ($p < 0,05$) к 30–60 суткам. Этот результат позволяет полагать, что увеличение уровня содержания общих ГАГ в основном происходит за счет несульфатированных ГАГ (гиалуроновой кислоты). Изученные параметры возвращались к контрольным значениям на 90 сутки, однако наблюдался достаточно значительный период (до 1,5 месяцев) ухудшения состава ВКМ. Тем не менее многократное введение DXM не оказывало статистически значимых изменений на содержание молекул ХС и ГС в нормальной ткани головного мозга мышей.

Таким образом, многократное введение DXM приводит к изменениям в структуре ВКМ нормальной ткани головного мозга мышей, воздействуя на общие и высокосульфатированные ГАГ, а также на некоторые гены ПГ и системы биосинтеза ГС. Эти изменения могут демонстрировать механизм побочных эффектов глюкокортикоидов, который позволит инициировать поиск препаратов для защиты компонентов ВКМ во время и после терапии, либо ослабить это побочное воздействие.

Литература

1. Theocharis A. D., Skandalis S. S., Gialeli C. et al. Extracellular matrix structure // Advanced Drug Delivery Reviews. 2016. Vol. 97. P. 4–27.

2. Iozzo R. V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans // Matrix Biology. 2015. Vol. 42. P. 11–55.

3. 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.

4. Wei F., Song J., Zhang C. et al. Chronic stress impairs the aquaporin-4-mediated glymphatic transport through glucocorticoid signaling // Psychopharmacology. 2019. Vol. 236. P. 1367–1384.

5. Tsidulko A. Y., Bezier C., de La Bourdonnaye G. et al. Conventional anti-glioblastoma chemotherapy affects proteoglycan composition of brain extracellular matrix in rat experimental model *in vivo* // Frontiers Pharmacology. 2018. Vol. 2. P. 1104.

6. Аладьев С. Д., Соколов Д. К., Строкотова А. В. и др. Влияние дексаметазона на экспрессию и содержание гликозилированных компонентов в ткани головного мозга мышей // Успехи молекулярной онкологии. 2023. Т. 10 (1). С. 25–39.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-295

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ДНКАЗЫ I И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ВНДНК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ *

THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF DNASE I AND PATHOLOGICAL EFFECTS OF CFDNA IN VARIOUS TUMOR DISEASES

Л. А. Алексеева, А. А. Филатова, Н. Л. Миронова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

L. A. Alekseeva, A. A. Filatova, N. L. Mironova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ alekseeva.mila.23@yandex.com

Аннотация

Избыточная внеклеточная ДНК (внДНК) при развитии патологических заболеваний может выступать в качестве активатора различных процессов, приводящих к усилению туморогенеза, в том числе к прямой активации опухолевых клеток. ДНКаза I предлагается в качестве эффективного противоопухолевого и антиметастатического препарата.

Abstract

Excess cell-free DNA (cfDNA) during the development of pathological diseases can act as an activator of various processes leading to increased tumorigenesis, including direct activation of tumor cells. DNase I is proposed as an effective antitumor and antimetastatic drug.

Внеклеточная циркулирующая ДНК (внДНК) представляет интерес в качестве жидкостной биопсии для ранней диагностики и прогноза течения различных заболеваний. Все чаще предлагаются варианты использования жидкостной биопсии для молекулярного профилирования рака. Кроме того, выдвигаются предположения о возможных патогенных эффектах избыточной внДНК. В норме клиренс внДНК осуществляется в том числе секреторными нуклеазами. Тем не менее при патологических состояниях нормальное функционирование ДНКаз может нарушаться.

Нашей группой на нескольких мышиных моделях опухолей (карцинома легких LLC, меланома B16, лимфосаркома RLS40) показан антиметастатический потенциал бычьей ДНКазы I и человеческой рекомбинантной ДНКазы I и найдена корреляция между снижением количества метастазов и сокращением размера опухоли и снижением патологически повышенного уровня внДНК и повышением уровня ДНКазной активности крови. Кроме того, обе ДНКазы снижали миграционные свойства опухолевых клеток *in vitro*, а при значительном повышении их концентрации снижали жизнеспособность клеток.

В продолжении работы о механизме антиметастатического действия ДНКаз была поставлена цель — изучение биологических эффектов, которые оказывает внДНК на сами опухолевые клетки. При добавлении внДНК, выделенной из крови здоровых мышей или мышей с различными опухолями, мы не заметили изменений жизнеспособности клеток меланомы B16. Однако при изучении биологических эффектов внДНК из кондиционной среды клеток меланомы B16 мыши (cd-cfB16-внДНК) и фибробластов мыши L929 (cd-L929-внДНК) на клетки меланомы B16 *in vitro*, было обнаружено снижение жизнеспособности и миграционных свойств клеток B16 в присутствии cd-cfB16-внДНК в концентрациях 100–1000 нг/1 млн кл. Обработка клеток ДНКазой I убирала эти эффекты и повышение инвазивных свойств в присутствии cd-L929-внДНК в той же концентрации. Для исследования влияния внДНК на клетки меланомы B16 *in vivo* клетки B16 инкубировали с cd-cfB16-внДНК или cd-L929-внДНК в концентрации 100 нг/1 млн кл. и вводили внутривенно или подкожно мышам линии C57Bl с метастатической моделью меланомы или моделью с опухолевым узлом, соответственно. Обработка клеток B16 cd-L929-внДНК усиливала рост опухолевого узла и повышала медианное количество метастазов в группе мышей

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-14-00289).

© Л. А. Алексеева, А. А. Филатова, Н. Л. Миронова, 2024

с метастатической меланомой по сравнению с контрольной группой, тогда как предварительная обработка B16 с cd-cfB16-внДНК приводила к снижению роста опухоли и метастазирования. В процессе исследования было показано, что cd-cfB16-внДНК характеризовалось повышенным количеством митохондриальной ДНК в составе и сниженным уровнем метилирования по сравнению с cd-L929-внДНК.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что внДНК может быть важной терапевтической мишенью при разработке противоопухолевых препаратов, а ДНКазы могут рассматриваться в качестве важных противоопухолевых и антиметастатических агентов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-296

NY-ESO-1 TCR T-КЛЕТКИ ПРОЯВЛЯЮТ МОЩНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЛАНОМЫ SK-MEL-37 *

NY-ESO-1 TCR T-CELLS SHOW A POTENT ANTI-TUMOR ACTIVITY IN THE SK-MEL-37 MELANOMA MURINE XENOGRAFT MODEL

А. Алсаллум[1,2], С. Алрхмун[1,2], О. Ю. Перик-Заводская[1], М. С. Фишер[1], М. О. Волынец[1,2], Ю. А. Лопатникова[1], Р. Ю. Перик-Заводский[1], Ю. А. Шевченко[1], Ю. Г. Филиппова[1], О. И. Соловьева[3], Е. Л. Завьялов[3], В. В. Курилин[1], Х. Шику[4], А. Н. Силков[1], С. В. Сенников[1,2]

[1]Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск
[2]Новосибирский государственный университет
[3]Центр коллективного пользования SPF-виварий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск
[4]Университет Мие, Цу, Япония

A. Alsalloum[1,2], S. Alrhmoun[1,2], O. Yu. Perik-Zavodskaia[1], M. S. Fisher[1], M. O. Volynets[1,2], J. A. Lopatnikova[1], R. Yu. Perik-Zavodskii[1], J. A. Shevchenko[1], J. G. Philippova[1], O. I. Solovieva[3], E. L. Zavjalov[3], V. V. Kurilin[1], H. Shiku[4], A. N. Silkov[1], S. V. Sennikov[1,2]

[1]Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk
[2]Novosibirsk State University
[3]Center for Collective Use SPF-vivarium ICG SB RAS, Novosibirsk
[4]Mie University, Tsu, Japan

✉ alaa.alsalloum19996@gmail.com

Аннотация

TCR-инженерные Т-клетки, нацеленные на внутриклеточные антигены, представляют собой перспективный подход к лечению рака. Однако механизмы, определяющие их эффективность против клеток-мишеней, остаются неуловимыми. В этом исследовании использовались современные методы для изучения адаптации и функционального состояния Т-клеток с TCR, специфичным к NY-ESO-1, *in vivo*. Мы выявили уникальную субпопуляцию CD8+ эффекторных Т-клеток, обладающую профилем экспрессии генов, характерным как CTL, так и NK-клеток.

Abstract

TCR-engineered T cells targeting intracellular antigens hold promise for cancer therapy. Yet, the mechanisms driving their effectiveness remain elusive. This study employed a cutting-edge approach to explore the adaptation and functional state of T cells with a TCR specific to NY-ESO-1 *in vivo*. We revealed a unique subset of CD8+ effector T cells, exhibiting a gene expression profile characteristic of both CTLs and NK cells.

NY-ESO-1 является раковым эмбриональным антигеном с ограниченной экспрессией в нормальных тканях [1]. Высокий уровень экспрессии NY-ESO-1 обнаружен в различных злокачественных опухолях, что делает его перспективной мишенью для противоопухолевой терапии [2, 3].

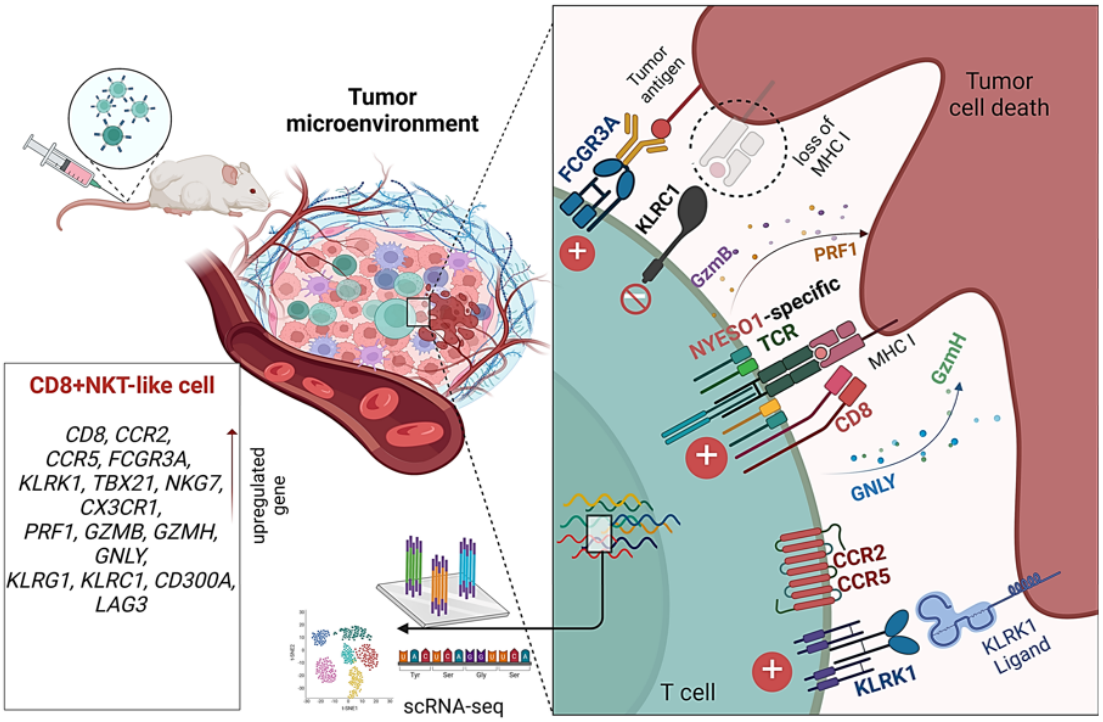
В данном исследовании Т-клетки были трансдуцированы ретровирусными конструкциями, экспрессирующими TCR, специфичный для пептида NY-ESO-1 157-165 в контексте HLA-A02:01 (ретровирусный вектор был предоставлен Высшей медицинской школой Университета Ми, Япония, под руководством профессора Х. Шику). На первом этапе исследования оценивалась цитотоксическая активность TCR-Т-клеток *in vitro*. Для этого трансдуцированные Т-клетки сокультивировались с опухолевыми клетками-мишенями. Фенотип Т-клеток анализировался методом проточной цитометрии, а продукция цитокинов оценивалась с помощью мультиплексного анализа.

На втором этапе исследования проводилось иммунное транскриптомное профилирование Т-клеток на платформе NanoString до и после трансдукции. Впоследствии трансдуцированные Т-клетки вводились внутривенно иммунодефицитным мышам линии NRG, несущим ксенотрансплантат клеток человеческой меланомы SK-MEL-37. После достижения полного регресса опухоли на 14-й день из периферической крови экспериментальных мышей выделялись CD3+ человеческие Т-клетки. Эти клетки подвергались секвенированию РНК единичных клеток (scRNA-seq) для изучения адаптации и функционального состояния Т-клеток *in vivo*.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 21-65-00004).

© А. Алсаллум, С. Алрхмун, О. Ю. Перик-Заводская, М. С. Фишер, М. О. Волынец, Ю. А. Лопатникова, Р. Ю. Перик-Заводский, Ю. А. Шевченко, Ю. Г. Филиппова, О. И. Соловьева, Е. Л. Завьялов, В. В. Курилин, Х. Шику, А. Н. Силков, С. В. Сенников, 2024

В ходе работы было отмечено значительное увеличение доли клеток, экспрессирующих CD8+CD107a+ +FasL+, примерно на 67,50 ± 3,899 % в культуре трансдуцированных клеток после сокультивирования с опухолевыми клетками. Это свидетельствует об увеличении цитотоксического потенциала TCR-модифицированных Т-клеток. Мультиплексный анализ показал значительное повышение продукции цитокинов (IFNG, TNFa, IL-17, IL-6) и факторов апоптоза (sFasL, гранзимы и перфорин) цитотоксическими лимфоцитами после контакта с клетками-мишенями по сравнению с нетрансдуцированными Т-лимфоцитами, что подтверждает их повышенную цитотоксическую активность. Анализ NanoString NY-ESO-1-специфичных TCR-Т-клеток показал повышение экспрессии ряда генов, включая ключевые хемокиновые рецепторы *CCR2* и *CCR5*, что свидетельствует об усиленной миграции Т-клеток к месту опухоли. Трансдуцированные Т-клетки полностью уничтожили ксенотрансплантат в модели меланомы SK-MEL-37, подтвердив свою эффективность. На 14-й день после введения Т-клеток секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq) выявило популяцию CD8+ эффекторных Т-клеток, характеризующихся экспрессией таких генов, как: *CCR2*, *CCR5*, *FCGR3A*, *KLRK1*, *TBX21*, *NKG7*, *GZMB*, *GZMH*, *GNLY*, *PRF1*, *CX3CR1*, *KLRC1*, *KLRG1*, *CD300A* и *LAG3*. Полученные данные свидетельствуют о наличии механизма двойного противоопухолевого эффекта — как антиген-независимый, подобный NK-клеткам, так и антиген-специфичный, подобный цитотоксическим Т-лимфоцитам (CTL) (см. рисунок).



Экспрессия генов в субпопуляции CD8+ Т-клеток, выделенных из периферической крови мышей NRG с успешным уничтожением ксенотрансплантата опухоли

Таким образом, полученные лимфоциты с TCR, специфичным к NY-ESO-1, демонстрируют способность к противоопухолевой активности *in vivo*. Данные исследования предоставляют ценную информацию о том, как клетки развиваются и адаптируются *in vivo*, подчеркивая потенциал оптимизации терапевтических стратегий с использованием уникальных характеристик CD8+ Т-клеток, обладающих свойствами NK-клеток.

Литература

1. Satie A.-P., Rajpert-De Meyts E., Spagnoli G. C., et al. The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ. Lab. Invest. 2002. 82: 775–780. https://doi.org/10.1097/01.lab.0000017169.26718.5f.

2. Aung P. P., Liu Y.-C., Ballester L. Y., et al. Expression of New York esophageal squamous cell carcinoma-1 in primary and metastatic melanoma. Hum. Pathol. 2014. 45: 259–267. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.05.029.

3. Raza A., Merhi M., Inchakalody V. P., et al. Unleashing the immune response to NY-ESO-1 cancer testis antigen as a potential target for cancer immunotherapy. J. Transl. Med. 2020. 18, 140. https://doi.org/10.1186/s12967-020-02306-y.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-297

ФИТОМИНЕРАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС КАК ФАКТОР АНТИСТАРЕНИЯ ЧЕРЕЗ ОПТИМИЗАЦИЮ СТРУКТУРЫ И ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

PHYTOMINERAL COMPLEX AS AN ANTI-AGING FACTOR THROUGH OPTIMIZING THE STRUCTURE AND INCREASING THE FUNCTION OF THE LYMPHATIC SYSTEM

Е. Н. Амансахатова, Д. В. Иванов, В. Н. Горчаков

Новосибирский государственный университет

E. N. Amansahatova, D. V. Ivanov, V. N. Gorchakov

Novosibirsk State University

✉ vgorchak@yandex.ru

Аннотация

Активное функционирование лимфатической (лимфоидной) системы является важным моментом в замедлении старения, повышения неспецифической устойчивости и предотвращения полиморбидности. Достичь этого можно применением фитоминерального комплекса с лимфотропными свойствами. Показано структурно-модифицирующее действие фитопрепарата на структуру и микроэлементный профиль лимфоузла стареющих животных.

Abstract

The active functioning of the lymphatic (lymphoid) system is an important point in slowing down aging, increasing nonspecific resistance and preventing polymorbidity. This can be achieved by using a phytomineral complex with lymphotropic properties. The structure-modifying effect of the herbal medicine on the structure and microelement profile of the lymph nodes of aging animals was shown.

Старение органов и систем в значительной степени зависит от работы лимфатической системы [1]. Последние достижения подтверждают заинтересованность лимфатической системы при старении и развитии возрастной патологии [1, 2]. Становится очевидным выбор лимфатической системы (лимфоузлов) в качестве мишени для коррекции и разработки эффективной стратегии замедления старения. Фитотерапия и нутрицевтические подходы могут быть многообещающими при борьбе со старением [3]. Аналогом можно рассматривать фитоминеральный комплекс *IQdetoxSORB* как элемент функционального питания. Эффект связан с наличием биоактивных ингредиентов — флавоноидов, микроэлементов и других нутриентов, имеющихся в растениях.

Цель исследования — предоставить доказательства лимфотропного эффекта растительно-минерального комплекса для активации лимфатической системы (лимфоузлов), дестабилизированной в период старения.

Эксперимент был осуществлен на 160 белых крысах Wistar с подразделением на молодых (возраст 3–5 мес.) и старых (возраст 1,5–2 г.). Половина животных получала фитоминеральный комплекс *IQdetoxSORB* (СПФ «СИБКРУК», Кольцово, Новосибирск) из расчета суточной дозы 0,2 г/кг в течение месяца. Фитокомпозиция состоит из двух компонентов: пищевые волокна и технологически измельченные растения Сибири [2]. По завершении эксперимента забирали лимфоузлы для гистологического исследования и для определения микроэлементов методом рентгенофлуоресцентного анализа с помощью синхротронного излучения (РФА СИ, ИЯФ СО РАН) [4]. Статистический анализ осуществляли в программе StatPlus Pro и использовали метод динамических рядов, сравнивая начальный или базовый («yo») и конечный («yi») ряды данных. Расчет коэффициента роста (Cg) показывает интенсивность изменений относительно базовой линии (baseline):

$$Cg = \frac{\text{yi}}{\text{yo}}.$$

Фитоминеральный комплекс повышает защитный уровень кластеров лимфатической системы, что важно для улучшения здоровья и качества жизни в пожилом и старческом возрасте. Если лимфатическая система активирована, траектория старения может быть изменена. Биоактивные растительные соединения корректируют структуру лимфоузлов, измененных старением, оказывая структурно-модифицирующее действие [2]. Показана избирательная модификация компартментов, судя по величине коэффициента роста

© Е. Н. Амансахатова, Д. В. Иванов, В. Н. Горчаков, 2024

на примере брыжеечного лимфоузла (рис. 1). Приближение коэффициента к базисной линии после фитопрепарата указывает на оптимизацию компартментов с формированием функционально активного морфотипа лимфоузла у стареющих животных.



Рис. 1. Коэффициент роста (Cg) для компартментов лимфоузла при старении и после приема фитопрепарата: К — капсула; Сс — субкапсулярный синус; Кп — корковое плато; П — паракортекс; лимфоидные узелки (фолликулы): Ф1 — первичные, Ф2 — вторичные; Мт — мозговые тяжи; Мс — мозговой синус

Наиболее показательно изменение В-зоны, занимаемой вторичными лимфоидными узелками, площадь которых увеличилась 1,4–1,6 раза после фитостимуляции (рис. 2). Фитопрепарат запускает пролиферацию клеток с локальным образованием «третичных лимфоидных узелков (фолликулов)». Их наблюдали в периферическом синусе вблизи коры, среди мозговых тяжей, внутри паракортикальной области в лимфоузлах старых крыс (см. рис. 2). Эти фолликулы являются временными структурами, и они появляются в качестве компенсации иммунной (лимфоидной) недостаточности, развивающейся при старении.

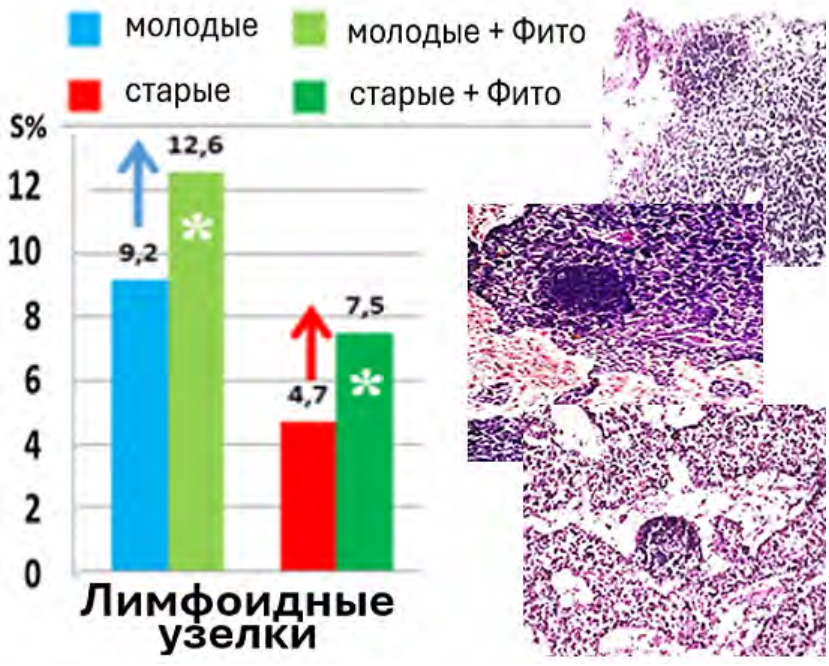


Рис. 2. Лимфоидные узелки крыс разных возрастов после приема фитопрепарата. «Третичные фолликулы» необычной локализации после фитостимуляции старых животных. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение: ок. 7 об. 20

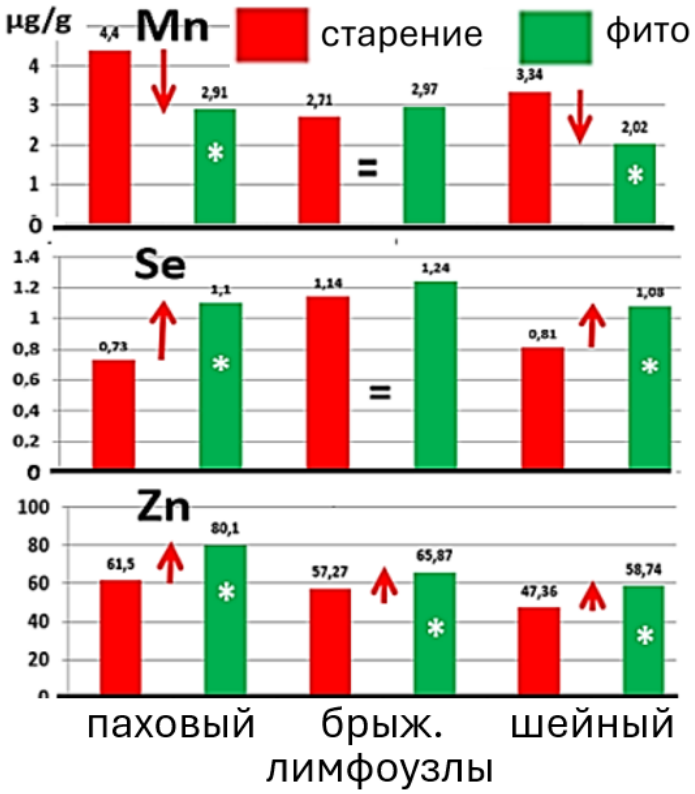


Рис. 3. Биоэлементы лимфоузлов при старении и после приема фитопрепарата. *P < 0,05 — статистически значимая разница

Фитонутриентная поддержка позволяет избавиться от дефицита большинства биоэлементов в измененной при старении лимфоидной ткани. Растения являются донатором микроэлементов. Поступление микроэлементов извне устраняет их дисбаланс, увеличивая концентрацию селена, цинка, меди и уменьшая избыток марганца в профиле лимфатических узлов старых животных (рис. 3), что благоприятно сказывается на структуре и функции лимфоузлов.

Таким образом, флавоноиды и микроэлементы растений влияют на составляющие кластеры лимфосанирующего механизма лимфатического региона при старении. Зафиксирован активный ответ лимфатической (лимфоидной) системы, что позволяет утверждать о наличии лимфотропных свойств у фитоминерального комплекса. Прием фитопрепарата замедляет и компенсирует возраст-обусловленные изменения в лимфоидной ткани, определяя парадигму о необходимости принимать растительные специализированные продукты пожилыми людьми для поддержки активного долголетия.

Литература

1. Бородин Ю. И. Лимфатическая система и старение // Фундаментальные исследования. 2011. № 5. С. 11–15. URL: https://fundamental-research.ru/ru/article/view?id=21252.

2. Gorchakov V., Nicolaychuk K., Gorchakova O., Demchenko G., Nurmakhanova B. Phytomineral complexes as elements of functional nutrition to enhance the protective function of the lymphatic system in aging // Biooctive Compounds in Health and Disease. 2024. Vol. 7(1). P. 1–16. DOI: doi.org/10.31989/bchd.v7il.12892014.

3. Martirosyan D., Kanya H., Nadalet C. Can functional foods reduce the risk of disease? Advancement of functional food definition and steps to create functional food products // Functional Foods in Health and Disease. 2021. Vol. 11(5). P. 213–221. DOI: https://www.doi.org/10.31989/ffhd.v11i5.788.

4. Piminov P. Synchrotron Radiation Research and Application at VEPP-4 // Physics Procedia. 2016. Vol. 84. P. 19–26. DOI: https://doi.org/10.1016/j.phpro.2016.11.005.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-298

РОЛЬ МАТРИКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА ПЕРИОСТИНА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

THE ROLE OF THE MATRICELLULAR PROTEIN PERIOSTIN ON THE EFFICIENCY OF CULTURING MAMMALIAN CELLS

А. С. Асякина, К. И. Мелконян

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар

A. S. Asyakina, K. I. Melkonyan

Kuban State Medical University, Krasnodar

✉ cnil.ksma@yandex.ru

Аннотация

В работе представлено влияние белка периостина на пролиферативную активность клеточной культуры фибробластов. Увеличение количества клеток при взаимодействии с периостином говорит о том, что этот белок может активировать специфические сигнальные пути, которые способствуют делению клеток и увеличивают их жизнеспособность. Повышение эффективности культивирования клеток открывает новые перспективы для их применения в регенеративной медицине.

Abstract

The work presents the effect of the periostin protein on the proliferative activity of a fibroblast cell culture. The increase in cell number upon interaction with periostin suggests that the protein activates specific signaling pathways that promote cell division and increase cell viability. This is important in cell therapy, where it is necessary to obtain sufficient numbers of cells for use. Increasing the efficiency of culturing autologous cells using periostin opens up new perspective for their use in regenerative medicine.

В современной клинической практике наиболее перспективным и успешным опытом лечения глубоких ожогов является использование методов клеточной терапии. По данным литературных источников, известно, что фибробласты при нанесении на поврежденные участки кожи оказывают непосредственное влияние на эпителизацию ран [1, 2]. В клинической практике чаще всего используют клетки аутологичного происхождения. Сравнительно с аллогенными клетками, которые взяты от донора другого человека, аутологичные клетки имеют меньше рисков, связанных с реакцией отторжения и инфекционными осложнениями контаминирующих агентов. Однако, несмотря на эти преимущества, всегда существует вероятность различных проблем, таких как формирование опухолей, или другие нежелательные реакции, даже при использовании аутологичных клеток [3]. Таким образом, при выборе между аутологичными и аллогенными клетками важно учитывать как преимущества, так и потенциальные риски. Важно отметить, что широкое применение клеточной терапии ограничивается длительным сроком получения достаточного количества биомассы — культивирование клеток до оптимального количества занимает не менее трех недель, что увеличивает риск развития инфекционных осложнений и удлиняет время пребывания пациентов в стационаре. Для оптимизации данного процесса требуется подбор условий, при выполнении которых станет возможным сократить срок наращивания необходимого количества клеток для проведения клеточной терапии [4]. Матриклеточный белок периостин (POSTN) способен прямо или косвенно влиять на клеточную морфологию, регулировать некоторые клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка, миграция, апоптоз, а также вызывать ремоделирование тканей [5].

Цель работы — изучить роль матриклеточного белка периостина на пролиферативную активность клеток.

Влияние POSTN на пролиферативную активность клеток оценивали при использовании дермальных фибробластов, полученных из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (линия DF-1). Для этого клетки засеивали на 12-луночный планшет в количестве 10 000 клеток на лунку и культивировали в модифицированной среде Игла Дульбекко (ДМЕМ «Биолот», Россия), которая является широко используемой для поддержки роста многих клеток млекопитающих с добавлением 10%-й фетальной сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия) и инкубацией в стандартных условиях (+37 °С, CO_2). Рекомбинантный белок POSTN (Cloud-clone Corp., США) добавляли в следующих концентрациях: 10 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл. В качестве положительного контроля выступал FGF (фактор роста фибробластов) (Cloud-clone Corp., США) в концентрации 50 нг/мл, в качестве отрицательного контроля — клетки, культивирующиеся только в пи-

© А. С. Асякина, К. И. Мелконян, 2024

тательной среде. Пролиферативную активность клеток оценивали, измеряя концентрацию клеток в камере Горяева в трех итерациях для каждого образца. Концентрацию коллагена I типа в супернатанте определяли с помощью тест-системы для ИФА (Cloud-clone Corp., США) согласно инструкции фирмы-производителя.

Проведен сравнительный анализ изменения количества клеток в лунках с различными концентрациями POSTN и контролем. Полученные данные представлены в таблице. При культивировании клеток с POSTN в течение 48 часов было выявлено его выраженное стимулирующее действие на пролиферативную активность DF-1, которая была выше на 32 % по сравнению с отрицательным контролем. При этом максимальные значения были получены в лунках с добавлением POSTN в концентрации 10 нг/мл, что повлияло на функциональную активность клеток и проявлялось активным синтезом коллагена I типа.

Оценка пролиферативной и функциональной активности клеток

Исследуемый образец	Средняя концентрация клеток	Коллаген I, нг/мл
Отрицательный контроль	61 250 ± 7500	9,12 ± 0,16
Положительный контроль	45 625 ± 4941	16,26 ± 0,54
POSTN 10 нг/мл	84 375 ± 6325	9,3 ± 0,1
POSTN 50 нг/мл	63 125 ± 2057	10,34 ± 0,16
POSTN 100 нг/мл	51 250 ± 4242	12,04 ± 0,23

Клеточная терапия является одним из перспективных методов лечения в медицине, который позволит восстанавливать поврежденные органы и ткани, активизируя регенеративные и адаптивные процессы в организме человека с использованием клеток, выращенных в условиях *in vitro*. Таким образом, применение матриклеточного белка периостина приводит к сокращению общего времени культивирования, что является важным шагом при подготовке клеток, так как позволяет в короткие сроки увеличить клеточную массу, необходимую для эффективного заживления ран.

Литература

1. Маркова А. Н., Лизунов А. В., Хамидулин Т. Э. Использование фибробластов в комбустиологии // Вестник Совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. 2016. Т. 3(14). С. 86–88.

2. Гилевич И. В., Федоренко Т. В., Коломийцева Е. А. и др. Достижения клеточной терапии в комбустиологии // Инновационная медицина Кубани. 2017. Т. 6(2). С. 6–14.

3. Туманов В. П., Жакота Д. А., Корчагина Н. С. 30-летний опыт разработки и применения клеточных технологий в клинической практике // Пластическая хирургия и косметология. 2012. № 3. С. 433–449.

4. Игнатенко С. И., Космачева С. М., Петевка Н. В. и др. Применение АВ (1\/)-сыворотки для наращивания мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека // Гены и клетки. 2010. Т. 5(3). С. 30–31.

5. Wu Z., Dai W., Wang P. et al. Periostin promotes migration, proliferation, and differentiation of human periodontal ligament mesenchymal stem cells // Connective tissue research. 2018. Vol. 59(2). P. 108–119.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-299

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРИ СПОНТАННОМ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ 2D2, TH И ГИБРИДОВ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ*

CATALYTIC ANTIBODIES DURING THE SPONTANEOUS DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL ENCEPHALOMYELITIS IN MICE OF 2D2, TH LINES AND FIRST-GENERATION HYBRIDS

К. С. Аулова, Г. А. Невинский

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

K. S. Aulova, G. A. Nevinsky

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ k.aulova@alumni.nsu.ru

Аннотация

Были исследованы параметры развития спонтанного экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита мышей, модели рассеянного склероза у гибридов первого поколения, полученных при скрещивании трансгенных линий 2D2 и Th. Данные сравнивали с аналогичными параметрами для мышей родительских линий 2D2 и Th.

Abstract

The parameters of the spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis development in mice, a model of multiple sclerosis, were investigated in first-generation hybrids obtained by crossing transgenic lines 2D2 and Th. The data were compared with similar parameters for mice of the parental lines 2D2 and Th.

Рассеянный склероз человека является хроническим воспалительным аутоиммунным заболеванием, которое на данный момент невозможно излечить полностью. Для исследования процессов демиелинизации аксонов нейронов, изучения взаимодействий иммунных и других клеток, а также различных молекул используют модели на животных, в частности, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит мышей (ЭАЭ). В классической модели у особей линии C57BL/6 данное заболевание инициируют иммунизацией пептидом миелин-олигодендроцитарного гликопротеина ($МОГ_{35-55}$), что приводит к пролиферации специфичных к миелину $CD4^+$ Т-лимфоцитов и способных к презентации пептидов миелина В-лимфоцитов. Поэтому на генетической основе линии C57BL/6 были созданы трансгенные линии мышей с Т-клеточными и В-клеточными рецепторами к миелин-олигодендроцитарному гликопротеину, а именно линии 2D2 (TCR^{MOG}) и Th (IgH^{MOG}). При скрещивании данных линий около 50 % гибридов 2D2×Th ($TCR^{MOG}×IgH^{MOG}$) подвержены спонтанному развитию экспериментального энцефаломиелита, в том числе в более раннем возрасте, чем особи родительских линий. Это указывает на кооперацию аутореактивных Т-клеток и В-клеток на начальной стадии заболевания.

Показано, что развитие некоторых аутоиммунных, вирусных, хронических и воспалительных заболеваний сопровождается образованием антител, которые не только связываются с антигенами, в том числе аутоантигенами, но и могут гидролизовать их. В данной работе анализировали образование каталитических антител и некоторые иммунологические параметры при развитии спонтанного ЭАЭ у гибридов 2D2×Th в сравнении с особями родительских линий 2D2 и Th, а также контрольной линии C57BL/6.

Активность IgG крови в гидролизе ДНК выявляют при различных заболеваниях, в частности, аутоиммунных. При этом каталитическая активность антител может не коррелировать с уровнем антител к субстрату. В начальный период развития ЭАЭ концентрация IgG, связывающихся с ДНК, у особей 2D2×Th выше, чем у мышей линий Th (в 4,6 раза) и 2D2 (в 25,7 раза). Однако активность IgG в гидролизе ДНК повышалась в 10,6 раза в течение заболевания к 30–60 дню эксперимента только у особей 2D2×Th. Также наблюдали выраженную активность IgG крови гибридов 2D2×Th в гидролизе пептида $МОГ_{35-55}$, основного белка миелина (ОБМ), и пяти гистонов (H1, H2A, H2B, H3 и H4). Несмотря на то, что количество антител к $МОГ_{35-55}$ в крови мышей 2D2×Th в нулевой точке эксперимента было выше, чем количество таких антител в крови особей 2D2 (в 2,1 раза) и Th (в 18,6 раза), активность IgG в гидролизе пептида у гибридов и особей исходных линий была сопоставимой.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-15-00103).

© К. С. Аулова, Г. А. Невинский, 2024

Изменение активности антител в гидролизе различных аутоантигенов сопровождались изменением как соотношения В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов в различных органах, так и профиля дифференцировки гемопоэтических клеток костного мозга. Например, у мышей 2D2×Th уже на 14 день эксперимента наблюдали повышение числа колоний, образованных смешанными колониеобразующими единицами (гранулоцитарно-эритроцитарно-моноцитарно-мегакариоцитарными), в то время как у особей линии 2D2 резкое повышение числа колоний наблюдали только к 30–40 дню. Также у особей 2D2×Th доля $CD4^+$ Т-лимфоцитов в крови, тимусе и лимфоузлах была выше, чем у линий 2D2 и Th на протяжении почти всего эксперимента.

Таким образом, были показаны различия параметров развития ЭАЭ у трансгенных линий мышей: 2D2 (TCR^{MOG}), Th (IgH^{MOG}), а также гибридов первого поколения 2D2×Th (TCR^{MOG}×IgH^{MOG}).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-300

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNF-A G-308A У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

TNF-A G-308A GENE POLYMORPHISM IN COVID-19 RUSSIAN PATIENTS OF THE CHELYABINSK REGION

С. Э. Баландина[1], С. В. Беляева[1,2], Д. С. Сташкевич[1]

[1] *Челябинский государственный университет*
[2] *Челябинская областная станция переливания крови*

S. E. Balandina[1], S. V. Belyaeva[1,2], D. S. Stashkevich[1]

[1] *Chelyabinsk State University*
[2] *Chelyabinsk Regional Blood Transfusion Station*

✉ lana.balandina.97@mail.ru

Аннотация

В работе представлен анализ распределения частот аллелей и генотипов SNP гена TNF-A G-308A у больных COVID-19 русских Челябинской области. Выявлено, что наличие различных аллелей данного цитокина в исследуемой популяции не влияет на чувствительность к развитию заболевания. Однако наблюдается особенность более частого наличия аллеля TNF-A (-308)*A у лиц с тяжелой формой COVID-19.

Abstract

The paper presents an analysis of the frequency distribution of alleles and genotypes of the TNF-A G-308A SNP gene in COVID-19 Russian patients of the Chelyabinsk region. It was revealed that the presence of various alleles of this cytokine in the studied population does not affect the sensitivity to the development of the disease. However, there is a feature of the more frequent presence of the TNF-A (-308) allele*A in people with severe COVID-19.

Введение

Существующие исследования показывают, что генетический фактор влияет на исход и тяжесть протекания новой коронавирусной инфекции 2019 года (COVID-19) (Heidari Nia M. et al., 2022). Развитие цитокинового шторма при COVID-19, как один из маркеров тяжести течения заболевания, может зависеть от наследуемого варианта генов провоспалительных цитокинов: IFN-γ, TNF-α, IL-1 и IL-6. Центральную роль в развитии цитокинового шторма играет TNF-α (Fara A. et al., 2020), который не только обладает мощным провоспалительным действием, но и оказывает плейотропный эффект на различные типы иммунных клеток (Sotomayor-Lugo F. et al., 2022). Несколько однонуклеотидных полиморфизмов, описанных в промоторной области гена TNF-A, оказывают значительное влияние на его транскрипционную активность. К ним относится полиморфизм TNF-A G-308A, который увеличивает уровни TNF-α. Однако избыточная экспрессия этого цитокина может приводить к неблагоприятному течению заболевания (Sotomayor-Lugo F. et al., 2022, Robinson P. C. et al., 2020).

Целью настоящей работы явился анализ частот аллелей и генотипов SNP гена TNF-A G-308A у больных COVID-19 русских Челябинской области.

Материалы и методы

Исследуемую группу составили пациенты противоковидных больниц Челябинска русской популяции в количестве 130 человек, с подтвержденной инфекцией COVID-19 и обследуемые в эпидемический период с декабря 2019 года по апрель 2021 года. Больные были поделены на 3 подгруппы по критерию тяжести заболевания: тяжелая, средняя и легкая формы (классификация степеней тяжести течения COVID-19, представленная в вариативных рекомендациях ВОЗ) [1]. Группу контроля составили условно здоровые доноры Челябинской областной станции переливания крови русской популяции в количестве 99 человек, не имеющие антител к SARS-CoV-2, прививок и не состоявшие в Федеральном регистре лиц, больных COVID-19.

Оценка критерия $\chi 2$ была проведена в онлайн-калькуляторе «Медицинская статистика». Оценку вероятности возникновения признака в исследуемой группе в зависимости от носительства определенного аллельного

© С. Э. Баландина, С. В. Беляева, Д. С. Сташкевич, 2024

варианта или генотипа проводили с помощью критерия отношения шансов (OR) и соответствующих 95 % доверительных интервалов (CI). Полученные результаты считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

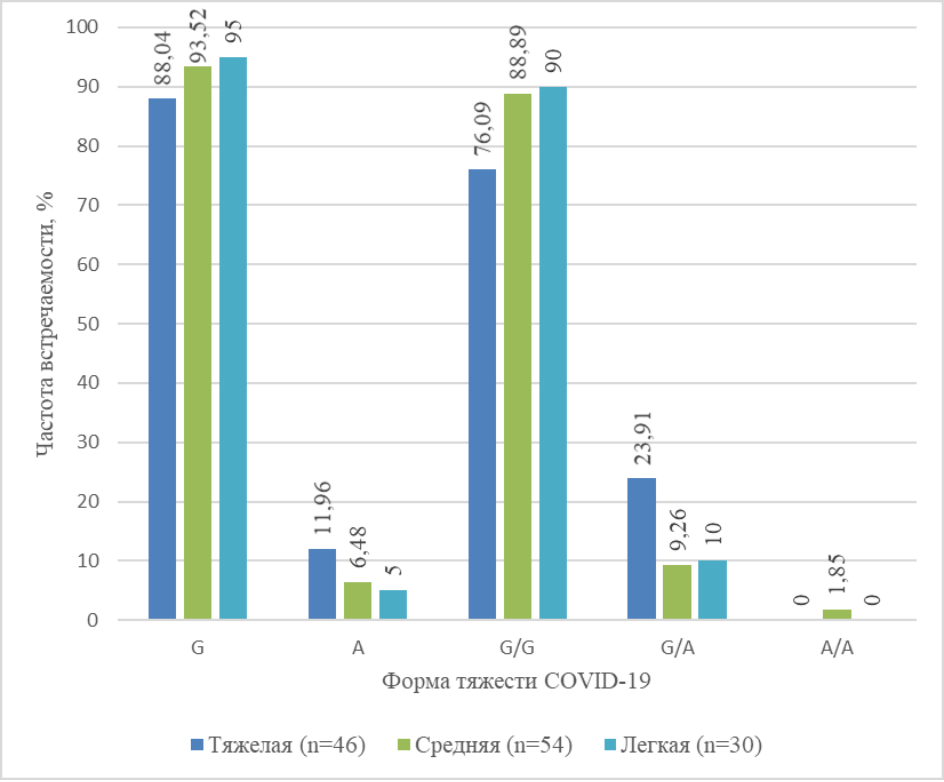
Результаты и их обсуждение

Распределение частот аллелей и генотипов гена TNF-A G-308A у больных COVID-19 в сравнении с условно здоровыми русскими Челябинской области представлено в таблице. С помощью анализа произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат были получены следующие значения: $\chi^2 = 1,950$, $p = 0,378$. Полученные данные свидетельствуют о том, что распределение аллелей и генотипов TNF-A G-308A у больных COVID-19 не отличаются от контрольной группы. Это позволяет утверждать — наличие различных аллелей данного цитокина в исследуемой популяции не влияет на чувствительность к развитию заболевания.

Распределение частот аллелей и генотипов гена TNF-A G-308A у больных COVID-19 и здоровых русских Челябинской области

TNF-A G-308A	Больные COVID-19, % n = 130	Контрольная группа, % n = 99	χ^2	p-Value	OR	CI	
Аллели							
G	91,9	89,9	0,565	0,453	1,279	0,673	2,431
A	8,1	10,1	0,565	0,453	0,782	0,411	1,487
Генотипы							
G/G	84,6	79,8	0,905	0,342	1,392	0,703	2,759
G/A	14,6	20,2	1,241	0,266	0,676	0,339	1,349
A/A	0,8	0	1	$p > 0,05$	–	–	–

Анализ распределения частот аллелей и генотипов гена TNF-A G-308A у больных COVID-19 русских Челябинской области с различным течением заболевания также не выявил достоверных различий (см. рисунок), анализ произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат показал следующие результаты: $\chi^2 = 6,240$, $p = 0,182$.



Распределение частот аллелей и генотипов гена TNF-A G-308A у больных COVID-19 русских Челябинской области с разными формами тяжести

По данным литературы, аллель TNF-A (-308)*A чаще встречался у лиц с тяжелой формой заболевания, в результате чего оказывал влияние на развитие симптомов COVID-19 (Sotomayor-Lugo F. et al., 2022). В нашем исследовании этот аллель также чаще встречается в группе с более тяжелой формой, но различия не достигают статистически значимых различий. Вероятно, в следующих работах необходимо увеличить выборки больных и рассмотреть межгенные взаимодействия данного цитокина с другими участниками иммунного ответа против вируса SARS-CoV-2.

Литература

1. Клиническое ведение случаев COVID-19: вариативные рекомендации, 13 января 2023 г. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 2023. (WHO/2019-nCoV/Clinical/2023.1). Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-301

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА СИНУКЛЕИНОПАТИЙ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ LRRK2 ДЛЯ ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕРАПИИ СИНУКЛЕИНОПАТИЙ*

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF SYNUCLEINOPATHIES. PERSPECTIVE OF LRRK2 KINASE ACTIVITY INHIBITION FOR THE PRECISION THERAPY OF SYNUCLEINOPATHIES

К. С. Башарова[1], А. И. Безрукова[1,2], Г. В. Байдакова[3], А. Э. Копытова[1,2], М. А. Николаев[1,2], 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], A. E. Kopytova[1,2], M. A. Nikolaev[1,2], 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 of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina
[2]Pavlov First Saint Petersburg State Medical University
[3]Research Center for Medical Genetics, Moscow
[4]Institute of Human Brain RAS, Saint Petersburg

✉ kbasharova@yandex.ru

Аннотация

Молекулярные механизмы синуклеинопатий неизвестны, как следствие, не существует биомаркеров и нейропротекторной терапии. Ранее было показано, что синуклеинопатии характеризуются нарушением активности лизосомных гидролаз, а киназа LRRK2 влияет на активность лизосомных гидролаз. В данном исследовании предложен биомаркер для дифференциальной диагностики синуклеинопатий и оценена возможность использования ингибитора LRRK2 для их терапии.

Abstract

The molecular mechanisms of synucleinopathies are unknown; as a result, there are no biomarkers or neuroprotective therapies. Previous studies have shown that synucleinopathies are characterized by activity lysosomal hydrolases activity, and kinase LRRK2 affects lysosomal hydrolases activity. In this study, we propose a biomarker for the differential diagnosis of synucleinopathies and evaluate the potential use of an LRRK2 inhibitor for their treatment.

Введение

Синуклеинопатии — группа нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина. Наиболее распространенной синуклеинопатией является болезнь Паркинсона (БП). БП, ассоциированная с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA1*, которые кодируют обогащенную лейциновыми повторами киназу 2 (LRRK2) и лизосомную гидролазу глюкоцереброзидазу (GCase), соответственно, являются самыми распространенными формами БП с известной этиологией. К синуклеинопатиям также относят деменцию с тельцами Леви (ДТЛ) и множественную системную атрофию (МСА) — наиболее злокачественную среди всех синуклеинопатий. Молекулярные механизмы и биомаркеры синуклеинопатий остаются неизвестны. Более того, на ранних стадиях синуклеинопатии имеют схожую клиническую картину. Ранее нами было показано, что синуклеинопатии характеризуются нарушением активности лизосомных гидролаз [1]. Также было продемонстрировано влияние ингибирования киназной активности LRRK2 на активность лизосомных гидролаз [2].

Цель — выявление биомаркера для дифференциальной диагностики синуклеинопатий на основе оценки активности лизосомных гидролаз и концентрации сфинголипидов и оценка возможности применения ингибитора киназной активности LRRK2 (MLi-2) для терапии различных форм синуклеинопатий.

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 1023031500037-7-1.6.8;1.6.1;1.6.2;1.6.3).

© К. С. Башарова, А. И. Безрукова, Г. В. Байдакова, А. Э. Копытова, М. А. Николаев, И. В. Милюхина, Е. Ю. Захарова, С. Н. Пчелина, Т. С. Усенко, 2024

Материалы и методы

Были получены макрофаги пациентов со сБП (N = 10), GBA1-БП (N = 9), LRRK2-БП (N = 4), MCA (N = 10), ДТЛ (N = 6) и индивидуумов контрольной группы (N = 8). Макрофаги культивировали без и в присутствии MLi-2 (Abcam, Англия). 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

Пациенты с GBA1-БП характеризовались снижением активности GCase в макрофагах по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Пациенты с LRRK2-БП характеризовались снижением активности GALC по сравнению с пациентами с GBA1-БП, а пациенты со сБП — снижением активности ASMase по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В свою очередь пациенты с MCA характеризовались сниженной активностью GCase, GALC и ASMase по сравнению с пациентами с БП и контролем ($p < 0,05$). Различий в активности лизосомных гидролаз в группе пациентов с ДТЛ выявлено не было ($p > 0,05$). Интересно, что все пациенты с синуклеинопатиями характеризовались повышенной концентрацией HexSph по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Пациенты со сБП и LRRK2-БП характеризовались повышенной концентрацией LysoGb3 по сравнению со всеми исследуемыми группами, а пациенты с MCA — только по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Пациенты с LRRK2-БП характеризовались повышенной концентрацией LysoSM по сравнению с пациентами с GBA1-БП и контролем ($p < 0,05$).

В ходе работы были выявлены пороговые значения исследуемых параметров для дифференциальной диагностики синуклеинопатий с помощью построения ROC кривых. При концентрации HexSph и LysoGb3 выше 1,37 нг/мл (AUC = 0,705, $p < 0,05$) и 6,2 нг/мл (AUC = 0,769, $p < 0,01$), соответственно, и активности GCase, GALC и ASMase выше 3,93 мМ/л/ч (AUC = 0,788, $p < 0,001$), 1,2 мМ/л/ч (AUC = 0,741, $p < 0,01$) и 0,71 мМ/л/ч (AUC = 0,708, $p < 0,05$), соответственно, диагностируют БП. В противоположном случае диагностируют MCA.

Ингибирование киназной активности LRRK2 увеличивало активность GCase в макрофагах пациентов с GBA1-БП ($p < 0,05$) до уровня наблюдаемого в макрофагах контроля без MLi-2 ($p > 0,05$), но не влияло на активность лизосомных гидролаз и концентрацию сфинголипидов в макрофагах пациентов со сБП, LRRK2-БП, MCA и ДТЛ ($p > 0,05$).

Выводы

Полученные данные подтверждают роль дисфункции лизосом в патогенезе синуклеинопатий. Все синуклеинопатии характеризуются повышенной концентрацией HexSph в макрофагах. Предложена дифференциальная диагностика БП и MCA, основанная на комплексной оценке активности GCase, GALC и ASMase и концентрации HexSph и LysoGb3 в макрофагах. Ингибирование киназной активности LRRK2 наиболее эффективно в отношении восстановления активности GCase в макрофагах пациентов с GBA1-БП, что открывает новые перспективы для терапии GBA1-БП, но не для других синуклеинопатий.

Литература

1. Usenko T. S. et al. Impaired Sphingolipid Hydrolase Activities in Dementia with Lewy Bodies and Multiple System Atrophy // Mol Neurobiol. 2022. Vol. 59(4). P. 2277–2287.

2. Усенко Т. С. с соавт. Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона // Медицинская генетика. 2022. Т. 21(12). С. 26–29.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-302

MTOR-ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *GBA1* *

MTOR-A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET FOR PARKINSON'S DISEASE WITH MUTATIONS IN THE *GBA1* GENE

А. И. Безрукова[1,2], К. С. Башарова[1], М. М. Руденок[3], Г. В. Байдакова[4], И. В. Милюхина[1,5], Е. Ю. Захарова[4], П. А. Сломинский[3], С. Н. Пчелина[1,2], Т. С. Усенко[1,2]

[1]*Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина*
[2]*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова*
[3]*Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва*
[4]*Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва*
[5]*Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург*

A. I. Bezrukova[1,2], K. S. Basharova[1], M. M. Rudenok[3], G. V. Baydakova[4], I. V. Miliukhina[1,5], E. Y. Zakharova[4], P. A. Slominsky[3], S. N. Pchelina[1,2], T. S. Usenko[1,2]

[1]*Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina*
[2]*Pavlov First Saint Petersburg State Medical University*
[3]*Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow*
[4]*Research Center for Medical Genetics, Moscow*
[5]*Institute of Human Brain RAS, Saint Petersburg*

✉ bz.nastya96@gmail.com

Аннотация

Молекулярные механизмы нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП), ассоциированной с мутациями в гене *GBA1*, кодирующем фермент глюкоцереброзидазу (GCase) (GBA1-БП), не известны. Анализ транскриптомов клеточной и животной моделей с индукцией паркинсонизма с дисфункцией GCase с последующей валидацией показал нарушение mTOR-зависимой аутофагии. Также была оценена потенциальная терапевтическая значимость mTOR для терапии GBA1-БП.

Abstract

The molecular mechanisms of the neurodegenerative disorder Parkinson's disease (PD) associated with mutations in the *GBA1* gene which encodes the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase) gene, (GBA1-PD) are unknown. Transcriptome analysis of cellular and animal models with induced parkinsonism and GCase dysfunction, followed by subsequent validation, showed impairment of mTOR-dependent autophagy. The potential therapeutic significance of mTOR for the treatment of GBA1-PD was also assessed.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание, в основе патогенеза которого лежит накопление белка альфа-синуклеина в черной субстанции (ЧС) головного мозга. БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1* (GBA1-БП), кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), является наиболее распространенной формой БП с известной этиологией. Молекулярные механизмы GBA1-БП не известны, и, как следствие, нейропротекторной терапии не существует.

Цель данной работы заключалась в поиске потенциальных терапевтических мишеней и биомаркеров GBA1-БП в ходе сопоставления транскриптомов клеточных и животных моделей паркинсонизма с дисфункцией GCase с последующей валидацией полученных данных и апробацией терапевтической мишени на клеточных моделях.

Полнотранскриптомный анализ проводился в клетках ЧС 4 мышей с индукцией паркинсонизма с дисфункцией GCase посредством сочетанного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (MPTP) и конду-

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-25-00212).

© А. И. Безрукова, К. С. Башарова, М. М. Руденок, Г. В. Байдакова, И. В. Милюхина, Е. Ю. Захарова, П. А. Сломинский, С. Н. Пчелина, Т. С. Усенко, 2024

ритол-b-эпоксида (CBE) (MPTP+CBE), 4 мышей с индукцией паркинсонизма (MPTP), 4 мышей с дисфункцией GCase (CBE) и 4 мышей с инъекцией NaCL (контроль), а также в первичной культуре макрофагов периферической крови (ПКМПК) 5 пациентов с GBA1-БП, 4 бессимптомных носителей мутаций в гене GBA1 (GBA1-носителей) и 5 неврологически здоровых индивидуумов (контроль).

Валидация выявленных дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГов) проводилась методом количественной ПЦР в режиме реального времени, и оценка значимости выявленных метаболических путей проводилась на уровне мРНК и белка методами количественной ПЦР в режиме реального времени, и вестерн-блот, соответственно, в мононуклеарах периферической крови 15 пациентов с GBA1-БП, 15 GBA1-носителей, 40 пациентов со спорадической формой БП (сБП) и 50 контроля. Апробация предложенной потенциальной мишени проводилась путем оценки биохимических параметров клетки, ассоциированных с БП, методом ВЭЖХ-МС/МС, иммунофлуоресценции и вестерн-блот путем аппликации селективного препарата к выявленной мишени на ПКМПК контрольной группы и на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y.

В ходе анализа транскриптома ЧС головного мозга мышей с MPTP+CBE, MPTP, CBE и контроля, а также ПКМПК пациентов с GBA1-БП, GBA1-носителей и контроля были получены списки ДЭГов и метаболических путей. Интересно отметить, что продукты генов с наиболее значимым изменением экспрессии, выявленные в ЧС головного мозга мышей с MPTP+CBE по сравнению со всеми исследуемыми группами (*Arl4d, Sgk1, Ddit4, Pdk4*) и в ПКМПК пациентов с GBA1-БП по сравнению с GBA1-носителями и контролем (*ARL4C, DUSP1, BCL6, TRIM13, EGR1, NR4A2, IL6*), регулируются PI3K/AKT/mTOR. В ходе валидации выявленных генов в мононуклеарах периферической крови пациентов с GBA1-БП было показано снижение экспрессии генов *ARL4C, DUSP1, ARL4D, IL6* по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и снижение экспрессии генов *ARL4C, DUSP1, NR4A2, DDIT4* ($p < 0,05$) по сравнению с GBA1-носителями, что подтверждает результаты анализа траснкриптомов. Ввиду многофункциональности пути PI3K/AKT/mTOR в клетке был оценен уровень мРНК (*mTOR, BECN1, SQSTM1, MAP1LC3B, CTSD*) и уровень ключевых белков процесса mTOR-зависимой аутофагии (p-mTOR (Ser2448), beclin-1, p62, LC3B-II, зрелая форма cathepsin D). Посредством аутофагии деградирует около половины альфа-синуклеина. Показано увеличение экспрессии гена *mTOR* у пациентов с GBA1-БП по сравнению с GBA1-носителями, контролем ($p < 0,05$), а также гена *MAP1LC3B* по сравнению с контролем ($p < 0,05$) на фоне снижения зрелой формы cathepsin D у пациентов с GBA1-БП, сБП и GBA1-носителей по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Носители мутаций в гене GBA1 независимо от статуса БП отличались повышенным уровнем белка beclin-1 по сравнению с пациентами со сБП и контролем ($p < 0,05$). Выявлено нарушение процесса аутофагии у носителей мутаций в гене *GBA1* как с установленным диагнозом БП, так и без него.

В ходе апробации выявленной потенциальной терапевтической мишени mTOR на ПКМПК и клеточной линии SH-SY5Y при обработке ингибитором активности mTOR Торином 1 показано увеличение степени колокализации LC3B с лизосомой и увеличение белка GCase без изменения активности GCase и ее субстрата. Показано снижение токсичной фосфорилированной формы белка альфа-синуклеина (Ser129) наряду с увеличением его стабильной тетрамерной формы при обработке клеточной линии SH-SY5Y Торином 1.

Таким образом, GBA1-БП характеризуется нарушением mTOR-зависимой аутофагии. Воздействие на активность mTOR может рассматриваться в качестве потенциальной терапевтической стратегии для терапии GBA1-БП.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-303

РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТА СЕГМЕНТАЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ НА МРТ-СНИМКАХ В РАМКАХ СОЗДАНИЯ СИСТЕМЫ КОРРЕКТИРОВКИ АБЛЯЦИИ

DEVELOPMENT OF AN ATRIAL SEGMENTATION TOOL ON MRI IMAGES AS PART OF THE CREATION OF AN ABLATION CORRECTION SYSTEM

А. К. Бережной[1,2],4, М. М. Слотвицкий[1,2,4], Д. А. Паршин[2], А. С. Селиванов[1], А. Г. Демин[2], А. И. Калинин[1], В. Д. Наумов[1], А. П. Синицына[1], В. А. Сыровнев[3], В. С. Кириллова[5], А. А. Аитова[1], В. А. Цвелая[1,2,4], К. И. Агладзе[1,4]

[1]Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), факультет биологической и медицинской физики
[2]Университет ИТМО, Санкт-Петербург
[3]Клиническая больница № 1 (Волынская) Управления делами Президента РФ, Москва
[4]Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского
[5]Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск

A. K. Berezhnoy[1,2,4], M. M. Slotvitskiy[1,2,4], D. A. Parshin[2], A. S. Selivanov[1], A. G. Demin[2], A. I. Kalinin[1], V. D. Naumov[1], A. P. Sinitsyna[1], V. A. Syrovnev[3], V. S. Kirillova[5], A. A. Aitova[1], V. A. Tsvelay[1,2,4], K. I. Agladze[1,4]

[1]Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Faculty of Biological and Medical Physics
[2]ITMO University, Saint Petersburg
[3]Clinical Hospital № 1 (Volynskaya) of the Office of the President of the Russian Federation, Moscow
[4]Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute
[5]Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk

✉ berezhnoi.ak@phystech.edu

Аннотация

Фибрилляция предсердий — одно из самых распространенных сердечно-сосудистых заболеваний, основной метод лечения персистирующей формы заболевания — сердечная абляция. Для такой операции широко распространены рецидивы, представленная работа предлагает подход к решению этой проблемы путем предсказания оптимального протокола операции в персонализированной математической модели предсердия пациента.

Abstract

Atrial fibrillation is one of the most common cardiovascular diseases, the main method of treating a persistent form of the disease is cardiac ablation. Relapses are widespread for such an operation, and the presented work suggests an approach to solving this problem by predicting the optimal surgery protocol in a personalized mathematical model of the patient's atrium.

Согласно исследованиям Всемирной организации, сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее распространенной причиной смертности среди трудоспособного населения развитых стран [1, 2]. Высоко распространены фибрилляции предсердий (ФП), это заболевание поражает до 2 % взрослого населения развитых стран [2]. Прогнозирование и оценка риска возникновения аритмий (волн реентри) является актуальной задачей для современного здравоохранения.

Основным методом лечения ФП является абляция — создание искусственных препятствий на поверхности ткани, призванных остановить возникновение и развитие спиральных волн. Однако процент рецидивов при проведении таких операций крайне высок: более половины пациентов возвращаются на повторную операцию [3], поскольку аритмия возникает повторно в новых условиях. В данной работе описана разработка инструмента сегментации предсердий на МРТ-снимках в рамках создания пациент-специфичной модели сердечной ткани предсердий человека. Это необходимо для воссоздания формы предсердий пациента и неоднородностей в их ткани, способных служить субстратами (инициаторами) аритмий. С использованием полученной модели можно проводить симуляции волновой динамики в ткани и в результате предсказывать оптимальный протокол операции для выбранного пациента.

© А. К. Бережной, М. М. Слотвицкий, Д. А. Паршин, А. С. Селиванов, А. Г. Демин, А. И. Калинин, В. Д. Наумов, А. П. Синицына, В. А. Сыровнев, В. С. Кириллова, А. А. Аитова, В. А. Цвелая, К. И. Агладзе, 2024

В рамках исследования были вручную размечены МРТ-изображения из открытых источников и полученные благодаря партнерству с лечебными учреждениями. С использованием этих данных была обучена нейронная сеть для сегментации стенок предсердий, внутреннего пространства предсердий и фиброза в ткани. Продолжается набор данных и доработка архитектуры нейронной сети, наибольшего внимания требует алгоритм сегментации фиброза в ткани, что связано с очень малыми размерами таких зон на снимке.

В основу модели электрофизиологии легли модели Contermanche [4] и Поттса [5]. Первая показала себя как хорошо описывающая электрофизиологию кардиомиоцитов и аритмогенность ткани. В основе имитации лежит численное решение системы уравнений типа Ходжкина — Хаксли. Вторая является моделью адгезии кардиомиоцитов на поверхность, отражает формирование монослоя человеческих сердечных клеток.

На основе указанных моделей создана модель сердечной ткани с электрофизиологией, отвечающей параметрам предсердной ткани человека. В дальнейшем будет проведена работа по интеграции в модель МРТ-данных, цельная система моделирования волновой динамики в ткани предсердий с учетом индивидуальных особенностей пациента станет доступной к использованию.

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. Т. 388. № 10053. С. 1459–1544.

2. Roth, Gregory A., et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. Circulation 132.17 (2015): 1667–1678.

3. Долгинина С. И., Хохлунов С. М. Предикторы рецидива фибрилляции предсердий после ее катетерной абляции // Медицинский альманах. 2015. № 3 (38). С. 93–96.

4. 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. Т. 275. № 1. С. H301–H321.

5. Kudryashova N., Nizamieva A., Tsvelaya V., Panfilov A., Agladze K. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells, https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006597.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-304

ИЗМЕНЕНИЕ БАЛАНСА ВРОЖДЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

CHANGES IN THE BALANCE OF INNATE LYMPHOID CELLS IN RHEUMATOID ARTHRITIS

О. С. Боева, Е. А. Пашкина, В. А. Козлов

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

O. S. Boeva, E. A. Pashkina, V. A. Kozlov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ starchenkova97@gmail.com

Аннотация

В работе было изучено соотношение ILC у пациентов с ревматоидным артритом (РА). Нами показано, при раннем РА баланс смещается в сторону ILC 2, а в процессе развития РА, наоборот, — в сторону ILC 1. Нарушение баланса ILC может способствовать развитию РА. Соответственно для лучшего понимания патогенеза РА необходимо дальнейшее изучение субпопуляционного состава, фенотипических и функциональных характеристик ILC при данном заболевании.

Abstract

In this work we studied the ratio of ILC in patients with RA. We have shown that in early RA the balance change towards ILC 2, and during the development of RA on the contrary towards ILC 1. ILC imbalance may contribute to the development of RA. To better understand the pathogenesis of RA, further study of the subpopulation composition, phenotypic and functional characteristics of ILC in this disease is necessary.

Ревматоидный артрит (РА) — системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением суставов и внесуставными поражениями. Известно, что данной патологией страдает примерно 1 % населения земли.

Считается, что задолго до проявления клинических проявлений и в процессе развития РА у пациентов происходят изменения в иммунной системе, в частности, в балансе различных компонентов иммунного ответа. Одними из факторов, которые могут значительно изменять баланс иммунного ответа, являются врожденные лимфоидные клетки (ILC). ILC — это гетерогенная группа клеток, которая находится преимущественно в тканях, а также присутствует в периферической крови в небольшом количестве, предположительно для миграции в целевые органы и ткани. ILC обладают функциональным разнообразием, сходным с Т-хелперами, а также ILC регулируют направленность иммунного ответа с помощью продукции цитокинов и обладают свойством пластичности. Благодаря своим свойствам, ILC играют важную роль при развитии многих заболеваний, в том числе при РА. Соответственно представляет интерес изучение баланса ILC при РА, в том числе и в динамике заболевания и при различных видах терапии.

Материалы и методы

МНК ПК n = 19 пациентов с РА и n = 10 условно здоровых доноров, МНК ПК выделяли из периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/мл). Затем клетки окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами: анти-Lineage (CD3/14/16/19/20/56) и анти-FceR1 alpha- FITC, анти-CD294- APC/Cy7, анти-CD127-PerCP/Cy5.5, анти-CD336-PE, анти-CD117-APC. Фенотип клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Анализ проводился с помощью GraphPad Prism 9.3.1, с использованием Краскелла — Уоллиса, значение p ($p < 0,05$) считалось минимальным критерием для статистической значимости.

Результаты и обсуждение

Терапия метотрексатом снижает общее количество ILC у пациентов с РА по сравнению с группой доноров и пациентов, получающих анти-В-клеточную терапию. Баланс ILC смещается в зависимости от терапии и стадии РА. При раннем РА снижается относительное количество ILC 1, но повышается ILC 2 по сравнению с развернутой стадией РА.

© О. С. Боева, Е. А. Пашкина, В. А. Козлов, 2024

В процессе развития стадии РА отмечается преобладание ILC 1 (развернутая и поздняя стадия РА), но снижается ILC 2 и ILC 3 у пациентов на терапии ритуксимабом. Фенотип ILC также изменяется у пациентов на ритуксимабе — отмечается снижение PD1-позитивных ILC 1 и ILC 3, но повышение PD1-позитивных ILC 1 и ILC 3 в группе пациентов, получающих метотрексат независимо от стадии РА.

Выводы

Терапия метотрексатом снижает общий пул ILC у пациентов с РА независимо от стадии РА, что свидетельствует о влиянии терапии метотрексатом на содержание ILC в периферической крови. На ранних стадиях РА при терапии метотрексатом снижается относительное количество ILC 1 и повышается ILC 2 и ILC 3 по сравнению с более поздними стадиями РА с таким же видом терапии, при этом по мере развития РА в случае терапии анти-B-клеточными агентами снижается доля ILC 3 по сравнению с терапией метотрексатом и повышается доля ILC1, что говорит о влиянии вида терапии, так и стадии РА на баланс ILC. Снижение PD1-позитивных ILC 1 и ILC 3 у пациентов, получающих анти-B-клеточную терапию, и повышение PD1-позитивных ILC 1 и ILC 3 в группе пациентов, получающих метотрексат независимо от стадии РА, говорит нам о влиянии терапии РА на фенотип клеток.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-305

ЭКСПРЕССИЯ «НЕКЛАССИЧЕСКИХ» МОЛЕКУЛ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ *

EXPRESSION OF "NON-CLASSICAL" MOLECULES OF THE MAIN HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX IN BRONCHIAL ASTHMA

В. И. Борисевич[1,2], О. С. Боева[2], Е. А. Пашкина[1,2]

[1]*Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России*
[2]*НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск*

V. I. Borisevich[1,2], O. S. Boeva[2], E. A. Pashkina[1,2]

[1]*Novosibirsk State Medical University*
[2]*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk*

✉ borvad2001@mail.ru

Аннотация

В данной работе мы оценили поверхностную экспрессию HLA-E у пациентов с бронхиальной астмой (БА) в сравнении с группой условно здоровых доноров. Нами показано, что пациенты с БА имели более низкий уровень экспрессии HLA-E на $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитах и на $CD14^+$ клетках (моноцитах), чем у группы условно здоровых доноров.

Abstract

In this work we assessed the surface expression of HLA-E in patients with bronchial asthma in comparison with a group of healthy donors. We showed that patients with BA had a lower level of HLA-E expression on $CD8^+$ cytotoxic T cells and $CD14^+$ cells than in a group of conditionally healthy donors.

В последнее время появляется все больше исследований в отношении «неклассических» молекул главного комплекса гистосовместимости. Данные, доказывающие хоть и несомненную, но все еще неоднозначную роль молекул данной группы в иммунном ответе, делают данную группу привлекательной для изучения. Наиболее изученной среди всех «неклассических» МНС (HLA-E,G,F) является HLA-G. Известно, что относительно высокая экспрессия данной молекулы наблюдается в клетках респираторного эпителия бронхов. Кроме того, предыдущие исследования подтверждают ее участие в патогенезе развития бронхиальной астмы (БА) [1]. Роль другой «неклассической» МНС, HLA-E, остается малоизученной. HLA-E представляет собой гетеродимер, центральной частью которого является пептидсвязывающая бороздка, где могут быть представлены короткие пептиды. HLA-E является лигандом для суперсемейства лектиноподобных рецепторов NKG2, представленными как на NK-клетках, так и на Т-лимфоцитах, а также могут связываться со специфичными TCR. Наиболее изучено взаимодействие NK-клеток с ингибирующими NKG2A рецепторами, в результате чего подавляется лизис, который опосредован NK-клетками [2, 3].

На сегодняшний день в мировой литературе не описана роль HLA-E при БА, следовательно, представляется актуальным изучение роли HLA-E при аллергических заболеваниях, в том числе БА и АД.

Целью исследования было сравнить поверхностную экспрессию HLA-E у условно здоровых доноров и пациентов с БА. МНК ПК пациентов с БА (n = 19) и условно здоровых доноров (n = 16) выделяли из периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/мл). Затем клетки окрашивали моноклональными антителами, конъюгированными с флюорохромами: анти-CD3-APC, анти-CD4-APC-Cy7, анти-CD-14-FITC и анти-HLA-E-PerCP/Cy5. Фенотип клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD Biosciences, США). Анализ проводился с помощью GraphPad Prism 9.3.1, с использованием Краскела — Уоллиса, значение p ($p < 0,05$) считалось минимальным критерием для статистической значимости.

Мы обнаружили, что при БА достоверно уровень экспрессии молекул HLA-E на $CD8^+$ Т-клетках и на $CD14^+$ клетках (моноцитах) ниже, чем у группы условно здоровых доноров.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 24-15-00409).

© В. И. Борисевич, О. С. Боева, Е. А. Пашкина, 2024

Таким образом, уровень экспрессии HLA-E на иммунокомпетентных клетках в группе доноров и в группе пациентов с БА различается. Достоверное снижение экспрессии данной молекулы у пациентов с БА на иммунокомпетентных клетках может свидетельствовать о возможной роли данной молекулы в патогенезе заболеваний.

Литература

1. Carlini F., Picard C., Garulli C., Piquemal D., Roubertoux P., Chiaroni J., Chanez P., Gras D., Di Cristofaro J. Bronchial Epithelial Cells from Asthmatic Patients Display Less Functional HLA-G Isoform Expression // Front Immunol. 2017.

2. Wang X., Xiong H., Ning Z. Implications of NKG2A in immunity and immune-mediated diseases // Front Immunol. 2022.

3. Joosten S.A., Sullivan L.C., Ottenhoff T.H.M. Characteristics of HLA-E Restricted T-Cell Responses and Their Role in Infectious Diseases // Journal of Immunology Research, 2016.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-306

ИЗМЕНЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АЛКОГОЛЬНЫМ АБСТИНЕНТНЫМ СИНДРОМОМ В ПЕРВЫЕ ПЯТЬ ДНЕЙ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ И ИХ СВЯЗЬ С ПСИХИЧЕСКОЙ СИМПТОМАТИКОЙ *

CHANGES IN LABORATORY BLOOD PARAMETERS OF PATIENTS WITH ALCOHOL WITHDRAWAL SYNDROME IN THE FIRST FIVE DAYS OF HOSPITALIZATION AND THEIR RELATIONSHIP WITH MENTAL SYMPTOMS

П. И. Брит[1,2], М. М. Меламуд[1], Д. В. Бобрик[3], И. С. Ефремов[4], Е. А. Ахметова[3,4], А. Р. Асадуллин[3,4], Г. А. Невинский[1], В. Н. Бунева[1], Е. А. Ермаков[1,2]

[1]Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск
[2]Новосибирский государственный университет
[3]Башкирский государственный медицинский университет, Уфа
[4]Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и неврологии им. В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург

P. I. Brit[1,2], M. M. Melamud[1], D. V. Bobrik[3], I. S. Efremov[4], E. A. Akhmetova[3,4], A. R. Asadullin[3,4], G. A. Nevinsky[1], V. N. Buneva[1], E. A. Ermakov[1,2]

[1]Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk
[2]Novosibirsk State University
[3]Bashkir State Medical University, Ufa
[4] Bekhterev National Research Medical Center for Psychiatry and Neurology, Saint Petersburg

✉ p.brit@g.nsu.ru

Аннотация

В работе представлены изменения лабораторных показателей крови пациентов с алкогольной абстиненцией за первые пять дней госпитализации. Показано, что у пациентов увеличивается уровень лимфоцитов, тромбоцитов, глюкозы. Концентрация общего холестерина, билирубина, общего белка и мочевой кислоты снижается. Снижение АСТ и АЛТ коррелирует с уменьшением баллов по шкале оценки синдрома отмены алкоголя и шкалы уровня бессонницы.

Abstract

The study presents changes in laboratory blood parameters of patients with alcohol withdrawal during the first five days of hospitalisation. It is shown that the level of lymphocytes, platelets, glucose increases in patients. The concentration of total cholesterol, bilirubin, total protein and uric acid decreases. The decrease in AST and ALT correlates with a decrease in alcohol withdrawal syndrome assessment scale scores and insomnia level.

Введение

Синдром алкогольной зависимости является распространенным заболеванием с серьезными социально-экономическими последствиями. Каждый второй человек, злоупотребляющий алкоголем, испытывает алкогольный абстинентный синдром. Поскольку алкогольный абстинентный синдром достигает своего пика в первые несколько дней после прекращения приема алкоголя, крайне важно отслеживать лабораторные показатели пациентов и выявлять те, которые могут быть связаны с тяжелым течением синдрома отмены.

Материалы и методы

В исследование включен 51 пациент мужского пола с алкогольным абстинентным синдромом (F10.3), проходящий стационарное лечение в больницах города Уфы. Постановка диагноза проводилась сертифицированными наркологами-психиатрами. Взятие крови проводилось в двух точках: при поступлении и на пятый день лечения. На пятый день состояние пациентов оценено по следующим шкалам: шкала оценки синдрома отмены алкоголя, MADRS, AUDIT, шкала депрессии Гамильтона, шкала астении, шкала сонливости Эпворта, индекс тя-

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-75-01136).

© П. И. Брит, М. М. Меламуд, Д. В. Бобрик, И. С. Ефремов, Е. А. Ахметова, А. Р. Асадуллин, Г. А. Невинский, В. Н. Бунева, Е. А. Ермаков, 2024

жести инсомнии, опросник уровня агрессивности Басса — Перри, AAQ-II, DRS-R-98. Статистическая обработка данных проводилась в программе Origin 2021.

Результаты

У пациентов выявлены значительные изменения в показателях общего анализа крови и биохимического анализа крови за пять дней госпитализации (см. таблицу). Значительно увеличилась концентрация лимфоцитов, тромбоцитов и глюкозы в крови. Активность АСТ и АЛТ, концентрация общего холестерина, общего билирубина, общего белка и мочевой кислоты снизилась.

При исследовании взаимосвязи лабораторных показателей и психолого-психиатрических шкал установлено, что снижение АСТ и АЛТ коррелирует со снижением значений шкалы оценки синдрома отмены алкоголя и индекса тяжести инсомнии.

Изменение лабораторных показателей крови у пациентов с алкогольным абстинентным синдромом через пять дней после госпитализации и корреляция изменений АСТ и АЛТ с психическим состоянием

Аналит	№	1 день (M (Q1–Q3))	5 день (M (Q1–Q3))	P-значение
LYM 10^9/л	51	1,6 (1,26–2,21)	2,03 (1,65–2,27)	0,02
MID 10^9/л	51	0,65 (0,32–1,23)	0,43 (0,26–0,73)	0,005
PLT 10^9/л	51	213 (142–295)	276 (204–366)	0,005
СОЭ мм/час	50	3 (2–8)	7,5 (2,75–13,25)	0,06
АСТ U/л	51	58,9 (28,9–96,6)	28,7 (22,1–47,6)	$2{,}2 \times 10^{-5}$
АЛТ U/л	51	41,6 (24,6–78,9)	31,7 (19,4–61,9)	0,07
Холестерин общ. ммоль/л	51	5,4 (4–6,9)	4,74 (3,99–5,65)	0,001
Билирубин общ. мкмоль/л	51	12 (8,4–17,9)	6,6 (4,4–9,3)	2.2×10^{-5}
Белок общ. г/л	51	75,2 (69,5–82,4)	71,1 (67,5–78,4)	0,005
Мочевина ммоль/л	51	4,5 (3,57–5,93)	3,84 (3,19–4,42)	$2{,}2 \times 10^{-4}$
Глюкоза ммоль/л	51	3,85 (3,14–4,8)	5,14 (4,2–5,96)	$4{,}4 \times 10^{-4}$
Корреляция изменения уровней АСТ и АЛТ с психическим состоянием пациентов				
		Шкала оценки синдрома отмены алкоголя	**Индекс тяжести инсомнии**	
АСТ (день 5/день 1)		R = 0,28; p = 0,048	R = 0,30; p = 0,034	
АЛТ (день 5/день 1)		R = 0,28; p = 0,043	R = 0,38; p = 0,006	

Обсуждение

Результаты настоящего исследования показывают, что в течение пяти дней после госпитализации у пациентов с алкогольным абстинентным синдромом происходит нарастание общего уровня воспаления за счет увеличения количества циркулирующих лимфоцитов, тромбоцитов, а также увеличения СОЭ. Несмотря на то, что в данной работе не было выявлено корреляций между этими показателями и изменениями в психике пациентов, ранее нами было продемонстрировано, что у пациентов с тяжелым течением синдрома отмены алкоголя наблюдается повышенный уровень ряда воспалительных маркеров [1].

Главным результатом этой работы можно считать то, что была показана прямая корреляция между уровнем снижения АСТ и АЛТ и количеством баллов по шкале оценки синдрома отмены алкоголя и индекса тяжести инсомнии. Таким образом, у пациентов, у которых регистрируется снижение активности АСТ и АЛТ, течение синдрома отмены легче, а у пациентов без значительного снижения АСТ и АЛТ синдром отмены протекает тяжелее. Полученные результаты согласуются с данными, что уровень АЛТ на пятый день госпитализации прямо коррелирует со шкалой CIWA-Ar, отражающей тяжесть синдрома отмены алкоголя [1].

Заключение

Результаты данной работы демонстрируют важность мониторирования лабораторных показателей крови у пациентов с синдромом отмены алкоголя. Пристальное внимание за уровнями АСТ и АЛТ, возможно, поможет лучше прогнозировать течение алкогольного абстинентного синдрома.

Литература

1. Melamud M. M., Bobrik D. V., Brit P. I. et al. Biochemical, Hematological, Inflammatory, and Gut Permeability Biomarkers in Patients with Alcohol Withdrawal Syndrome with and without Delirium Tremens // Journal of Clinical Medicine. 2024. Vol. 13. № 10. P. 2776.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-307

СЕКВЕНИРОВАНИЕ РНК ЛЕГКИХ ПОКАЗАЛО НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ НА КРЫСИНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКОЙ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ *

LUNG TISSUE RNA SEQUENCING SHOWS DYSREGULATION OF THE BRONCHIAL EPITHELIUM IN A RAT MODEL OF CHRONIC THROMBOEMBOLIC PULMONARY HYPERTENSION

Н. С. Вахрушев, А. А. Карпов, О. В. Калинина

Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург

N. S. Vakhrushev, A. A. Karpov, O. V. Kalinina

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg

✉ drabrikos@gmail.com

Аннотация

Для изучения молекулярных механизмов формирования хронической тромбоэмболической легочной гипертензии (ХТЭЛГ), выполнен анализ транскриптома тканей легких в крысиной модели ХТЭЛГ. Выявлены изменения, связанные с активностью ресничек, внеклеточным матриксом и иммунитетом. Гистологический анализ установил утолщение стенок бронхов, а также увеличение плотности эпителиоцитов при формировании ХТЭЛГ.

Abstract

To study the molecular mechanisms of the formation of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH), an analysis of the transcriptome of lung tissue was performed in a rat model of CTEPH. Changes associated with cilia activity, extracellular matrix, and immunity were identified. Histological analysis revealed thickening of the bronchial walls, as well as an increase in the density of epithelial cells during the formation of CTEPH.

Введение

Хроническая тромбоэмболическая легочная гипертензия (ХТЭЛГ) — это патологическое состояние, характеризующееся увеличением давления в легочной артерии вследствие стабильной обструкции легочных артерий и микрососудистым поражением. Для объяснения развития ХТЭЛГ были предложены различные патофизиологические механизмы, однако неизвестно, почему она возникает у меньшинства пациентов после острой тромбоэмболии. У пациентов с ХТЭЛГ наблюдается снижение индекса Тиффно и других респираторных показателей. Предполагается, что увеличенные легочные артерии могут механически сдавливать дыхательные пути [1].

Целью данной работы было исследовать молекулярные механизмы развития ХТЭЛГ у крыс, вызванной многократным введением альгинатных микросфер в хвостовую вену и охарактеризовать структурно-функциональные изменения в тканях легких на разных этапах развития ХТЭЛГ.

Материалы и методы

Крысам линии Wistar многократно вводили частично биодеградируемые микросферы на основе альгината натрия диаметром 160–200 мкм для эмболизации дистальных ветвей легочной артерии. Через 2 и 6 нед. после последнего введения микросфер извлекались ткани легкого для РНК-секвенирования и гистологического исследования.

Результаты

В группе ХТЭЛГ 2 нед. и ХТЭЛГ 6 нед. было идентифицировано 214 и 347 дифференциально экспрессирующихся генов, соответственно. Дальнейший анализ позволил выделить биологические процессы, изменяющиеся во времени. На 2 нед. развития ХТЭЛГ выражено изменение процессов, связанных с митохондриями, формированием эндотелиального слоя и цитоскелетом, в частности, двигательными цилиями. К 6 нед. количество путей, связанных с эндотелием, уменьшается, но увеличивается число каскадов, ассоциированных с цилиями: движение цилий, сборка двигательных цилий. В обеих группах обнаружено угнетение процессов, ассоциированных с си-

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-75-10122).

© Н. С. Вахрушев, А. А. Карпов, О. В. Калинина, 2024

напсами и нейронами, что свидетельствует о вовлеченности автономной нервной системы в патогенез ХТЭЛГ.

Поскольку двигательные цилии в ткани легких предположительно могут быть только у эпителиоцитов бронхов, то в дальнейшем было произведено гистологическое исследование дыхательных путей. Было изучено 102 бронха в группе ХТЭЛГ 2 нед., 114 бронхов в группе ХТЭЛГ 6 нед. и 43 в группе здоровых животных. В результате выявлены изменения толщины дыхательных путей, высоты и плотности эпителия бронхов. Индекс толщины бронхиальной стенки был значимо выше, как в группе ХТЭЛГ 2 нед. 54,4 (46,2; 64,4) %, так и в группе ХТЭЛГ 6 нед. 50,1 (42,3; 58,2) % по сравнению с группой контроля 29,7 (24,8; 36,0) %. Высота эпителия в группе контроля составила 8,0 (7,25; 9,56) мкм, в группах ХТЭЛГ значительно выше для 2 нед. — 17,11 (13,89; 20,67) мкм и для 6 нед. — 14,22 (12,55; 16,0) мкм. Количество эпителиоцитов на 50 мкм поверхности бронха в группе контроля составило 8,25 (7,67; 9,0), что было значимо меньше, чем в опытных группах: ХТЭЛГ 2 нед. — 12,33 (11,33; 13,0), ХТЭЛГ 6 нед. — 12,5 (11,33; 13,5). Также были обнаружены бронхи в группах ХТЭЛГ, в которых эпителий изменен неравномерно: более высокий эпителий и большее количество цитоплазмы в эпителиоцитах со стороны сосуда по сравнению с противоположной стороной бронха.

Заключение

Экспрессия генов, кодирующих компоненты экстрацеллюлярного матрикса, цитокины и хемокины, маркеры воспаления изменяются во времени и соответствуют разным стадиям течения заболевания: группа ХТЭЛГ 2 нед. — формирование патологического состояния и группа ХТЭЛГ 6 нед. — его разрешение. Увеличение толщины эпителия бронхов, разрастание подлежащей соединительной ткани в просвет бронхов, показанные у крыс в эксперименте, могут соответствовать процессам у людей, приводящим к ухудшению показателей дыхания у пациентов с ХТЭЛГ [2]. Установлено, что эпителиоциты бронхов увеличены в размере по сравнению с контролем, что способствует большему накоплению цитоплазмы и слизи. Наблюдается статистически значимая обструкция бронхов на 2 и 6 нед. по сравнению с контролем, возможная причина которой является миграция факторов воспаления и ремоделирвоания из поврежденных сосудов к бронхам.

Литература

1. Jing Z. C., Xu X. Q., Badesch D. B., Jiang X., Wu Y., Liu J. M., Wang Y., Pan L., Li H. P., Pu J. L., Zhang Z. L., Yang Y. J. Pulmonary function testing in patients with pulmonary arterial hypertension // Respir. Med. 2009. Aug, 103(8): 1136–42. DOI: 10.1016/j.rmed.2009.03.009. Epub 2009 Apr 28.

2. Low A. T., Medford A. R., Millar A. B., Tulloh R. M. Lung function in pulmonary hypertension // Respir. Med. 2015. Oct, 109(10):1244–9. DOI: 10.1016/j.rmed.2015.05.022. Epub 2015 May 27.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-308

ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ УЛЬТРАКОРОТКИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПОЛИДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДЫ — ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДНК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

NATIVE AND SYNTHETIC ULTRASHORT SINGLE-STRANDED POLYDEOXYRIBONUCLEOTIDES — INHIBITORS OF TUMOR CELL DNA REPAIR ENZYMES

А. С. Веденкин[1], С. В. Стовбун[1], А. А. Бухвостов[2], Д. А. Кузнецов[1,2]

[1]*Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва*
[2]*Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Москва*

A. S. Vedenkin[1], S. V. Stovbun[1], A. A. Bukhvostov[2], D. A. Kuznetsov[1,2]

[1]*Semenov Institute of Chemical Physics RAS, Moscow*
[2]*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow*

✉ a.s.vedenkin@gmail.com

Аннотация

Установлено высокое сродство эндогенных оцДНК$_{40\text{-}60}$ и синтетических аналогов к ферменту репарации ДНК-полимеразе β, а также их высокая противоопухолевая активность *in vitro* и *in vivo*. Изучен выход эндогенных оцДНК$_{40\text{-}60}$ из онкоклеток в различных условиях. Определен процентный состав азотистых оснований исследуемых веществ.

Abstract

It has been demonstrated that endogenous ssDNA$_{40\text{-}60}$ and synthetic analogs exhibit a high affinity for the DNA repair enzyme DNA polymerase β, and that they display significant antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. The yield of endogenous ssDNA$_{40\text{-}60}$ from cancer cells under different conditions was investigated. The percentage composition of nitrogenous bases of the investigated compounds was determined.

Дефекты в работе систем репарации ДНК, связанные с тяжелыми наследственными заболеваниями и старением человеческого организма, в подавляющем большинстве случаев являются причиной возникновения нейродегенеративных и онкозаболеваний. В то же время в онкотерапии используются подходы, основанные на направленном повреждении ДНК раковых клеток. При этом ингибирование репарации ДНК в процессе лечения повышает эффективность как химиотерапии, так и радиационной терапии. В связи с этим ключевые ферменты систем репарации являются важнейшими мишенями для ряда химиотерапевтических препаратов. Такой мишенью может служить основной репарационный фермент ДНК-полимераза β [1].

Ранее нами было экспериментально показано, что ультракороткие одноцепочечные полидезоксирибонуклеотиды (оцДНК) ингибируют активность ДНК полимеразы β. При этом эффективность их действия зависела в значительной мере от длины (40–100n) и в меньшей степени от нуклеотидного состава [2, 3].

Установлено, что эндогенные оцДНК$_{40\text{-}60}$, а также синтетические аналоги имеют высокую аффинность к ДНК полимеразе β. Константы диссоциации (Kd) комплекса ДНК-полимеразы β с оцДНК$_{40\text{-}60}$ и ряда синтетических аналогов составили 2,6–18,6 нМ. Kd сывороточного альбумина человека с теми же оцДНК в тех же условиях составляли около 0,2–2,0 мМ [4].

Поскольку ДНК-полимераза β является перспективной молекулярной мишенью в онкотерапии, нами было изучено действие коротких полидезоксирибонуклеотидов различного состава с указанными размерами *in vitro* на раковые клетки острого миелобластного лейкоза человека HL-60, также *in vivo* на мышиных моделях, показана их высокая противоопухолевая активность. Также мы показали, что раковые клетки увеличивают синтез ультракоротких оцДНК$_{40\text{-}60}$ под действием магнитного изотопа $^{25}Mg^{2+}$. Выход эндогенных оцДНК$_{40\text{-}60}$ из клеток HL-60 составил 126,7 ± 10,0 нг/мг белка, а в присутствии $^{25}Mg^{2+}$ выход составил 327,0 ± 16,8 нг/мг белка [4]. Был установлен процентный состав азотистых оснований выделенных оцДНК$_{40\text{-}60}$ из разных типов онкоклеток (острого миелобластного лейкоза HL-60 и двух линий ретинобластомы WERI-1A, Y-79), данные представлены в таблице. Исходя из полученных данных, мы рассматриваем оцДНК$_{40\text{-}60}$ в качестве перспективного противоракового средства.

© А. С. Веденкин, С. В. Стовбун, А. А. Бухвостов, Д. А. Кузнецов, 2024

Состав азотистых оснований (А.о.), выделенных оцДНК$_{40\text{-}60}$ из разных типов клеток

Тип клеток	А.о., %				A/T	G/C
	A	T	G	C		
HL-60	15,0	17,8	32,3	34,6	0,84	0,93
HL-60 + $^{25}Mg^{2+}$	16,2	18,9	33,4	30,0	0,86	1,11
WERI-1A	26,2	23,6	25,0	27,2	1,11	0,92
Y-79	27,0	24,1	22,7	26,3	1,12	0,86

Литература

1. Barakat K. H., Gajewski M. M., Tuszynski J. A. DNA polymerase beta (pol β) inhibitors: A comprehensive overview // Drug discovery today. 2012. Vol. 17. № 15–16. P. 913–920.

2. Stovbun S. et al. A new DNA repair-related platform for pharmaceutical outlook in cancer therapies: ultrashort single-stranded polynucleotides // Scientia Pharmaceutica. 2019. Vol. 87. № 4. P. 25.

3. Stovbun S. V. et al. L, D-Polydeoxyribonucleotides to provide an essential inhibitory effect on DNA polymerase β of human myeloid leukemia HL60 cells // Biochemistry and Biophysics Reports. 2020. Vol. 24. P. 100835.

4. Vedenkin A. S. et al. Anti-cancer activity of ultra-short single-stranded polydeoxyribonucleotides // Investigational New Drugs. 2023. Vol. 41. № 1. P. 153–161.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-309

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА, МОДИФИЦИРОВАННОГО L-АРГИНИНОМ

RECOVERY OF RAT PERIPHERAL NERVE AFTER DAMAGE UNDER THE INFLUENCE OF SUTURE MATERIAL MODIFIED WITH L-ARGININE

У. Е. Головачева

Ярославский государственный медицинский университет

U. E. Golovacheva

Yaroslavl State Medical University

✉ tsiganovauliana@mail.ru

Аннотация

Известно, что оксид азота (NO) синтезируется из L-аргинина. Роль NO в воспалении до конца не изучена. В настоящее время предложен способ ускорения регенерации нерва путем адгезии молекул лекарственного препарата на шовный материал. Таким препаратом был L-аргинин. Установлено, что он положительно влияет на прорастание нерва при повреждении, уменьшая воспаление уже с 7 дня наблюдения, способствуя прорастанию аксонов и ускоряя их миелинизацию.

Abstract

It is known that nitric oxide is synthesized from L-arginine. The NO role in inflammation has not been fully studied. Currently, a method has been proposed to accelerate the nerve regeneration damage by drug molecules adhesion to suture material. The such drug was L-arginine. During the study, it was found that it is a positive effect on the nerve germination in damage case, reducing the inflammation from the 7th observation day, contributing to the axons germination and accelerating their myelination.

В настоящее время предложен способ ускорения регенерации нервного волокна [1]. Были созданы нити полипропилен 8/0 с адгезией на них L-аргинина. Предполагается, что использование данных нитей вызовет поступление экзогенного NO, что повышает интенсивность микроциркуляции в зоне шва, уменьшая площадь гипоксического воздействия на окружающие ткани, блокируя воспаление и способствуя быстрому прорастанию нервных волокон.

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, на прорастание аксонов и восстановление миелиновых оболочек.

Материалы и методы

Животные были разделены на 2 группы: контрольную (шов нитью полипропилен 8/0) и экспериментальную (шов нитью пропилен 8/0 с адгезией L-аргинина) — по 9 крыс в каждой. Выбор препарата для модифицированной нити осуществляли согласно данным о возможных эффектах программы PASS-ONLINE.

Крысам выполнялся эпиневральный микрохирургический шов седалищного нерва «конец-в-конец». Фрагмент нерва исследовался на 7, 14 и 28 сутки после операции на парафиновых срезах. Для оценки воспаления при окраске гематоксилин-эозином замеряли диаметр зоны инфильтрации/рубца вокруг нити. Параллельно для оценки состояния миелиновой оболочки в проксимальном и дистальном участках, зоне шва нерва оценивали экспрессию бета-тубулина-3 (ß-Tub) (ab6046, UK, 1:250) и основного белка миелина (MBP) (ab62630, UK, 1:125). Подсчитывалась численная плотность волокон с сохраненной непрерывной позитивностью к маркерам на срезах стандартной площади (640 мкм^2) в 10 полях зрения в каждом случае. Статистические данные обрабатывались в MS Excel 2007. Для оценки достоверности данных использовался критерий Фишера (F) и коэффициент корреляции (r).

Результаты

Установлено, что на 7 сутки зона инфильтрации в экспериментальной группе была меньше контрольной на 10 %. В зоне шва и дистальном участке нерва в экспериментальной группе сохранялись протяженные ß-Tub-позитивные аксоны, тогда как в контрольной группе выявлялись лишь продукты распада. MBP в дистальных участ-

© У. Е. Головачева, 2024

ках нервов обеих групп распределялся в виде позитивных фрагментов распада разных размеров без сохранения целостности оболочки волокон.

На 14 сутки зона инфильтрации в экспериментальной группе была меньше контрольной почти в 5 раз. По сравнению с предыдущим сроком в контрольной группе она увеличилась (с 15 мкм до 48 мкм), а в экспериментальной достоверно не изменялась. В зоне шва и дистальном участке нерва экспериментальной группы наблюдались позитивные аксоны, их количество было в 2 раза достоверно больше, чем в контроле ($F = 0,78$). Часть аксонов проявляла очень высокую экспрессию ß-Tub, что позволило считать их колбами роста. Также на этом сроке в дистальном участке и в зоне шва нерва наблюдалось начало миелинизации волокон. В экспериментальной группе толщина миелиновых оболочек была достоверно выше, чем в контрольной ($F = 0,72$).

На 28 сутки в контрольной группе зона рубцовой ткани уменьшилась в 4 раза по сравнению с предыдущим сроком (10,16 мкм), в экспериментальной группе — еще на 30 %. В дистальном участке нерва в контрольной группе численной плотности аксонов по сравнению с предыдущим сроком не наблюдалось, в зоне шва произошло уменьшение показателя на 35 %. В обоих участках нерва в экспериментальной группе плотность аксонов увеличилась в 2 и 3 раза по сравнению с предыдущим сроком соответственно. Также в экспериментальной группе произошла полная миелинизация проросших волокон, в контрольной группе наряду с миелинизированными волокнами сохранялись продукты распада миелина ($F = 0,92$). Толщина восстановленных миелиновых оболочек также достоверно различалась между группами, контрольной и экспериментальной: в зоне шва — 0,24 мкм и 0,33 мкм; в дистальном участке — 0,19 мкм и 0,24 мкм соответственно ($F = 0,71$). Последняя характеристика в интактном нерве составляла 0,20 мкм.

Важно отметить, что величина формирующегося рубца была обратно пропорциональна количеству восстанавливающихся аксонов и миелиновых оболочек в обеих группах ($r = -0,60$ в контрольной группе и $r = -0,99$ в экспериментальной).

Вывод

L-аргинин положительно влияет на прорастание нервных волокон при повреждении, уменьшая воспалительную реакцию уже с 7 дня после шва нерва, тем самым способствуя прорастанию аксонов и ускоряя формирование миелиновых оболочек.

Литература

1. Петрова Е. С., Павлова Н. В., Коржевский Д. Э. Современные морфологические подходы к изучению регенерации периферических нервных проводников // Медицинский академический журнал, 2012. Т. 12, № 3. С. 15–23.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-310

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИСМЫСЛОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА*

APPLICATION OF ANTISENSE TECHNOLOGIES FOR THE TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS

И. О. Головкин, Г. В. Маслова, Н. Н. Пилявский, Т. П. Макалиш

Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь

I. O. Golovkin, G. V. Maslova, N. N. Pilyavsky, T. P. Makalish

Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol

✉ golovkin.io.1996@gmail.com

Аннотация

Предложено инъекционное и электрофоретическое введение антисмысловых олигонуклеотидов против фактора некроза опухоли и интерлейкина 6 — ключевых цитокинов в развитии ревматоидного артрита. В модели на лабораторных крысах изучены изменения костной ткани и хрящей, а также уровни цитокинов и матриксных металлопротеиназ в периферической крови и непосредственно в ткани сустава. Показана их эффективность в сравнении со стандартным лечением.

Abstract

Injection and electrophoretic administration of antisense oligonucleotides against tumor necrosis factor and interleukin 6, key cytokines in the development of rheumatoid arthritis, have been proposed. In a laboratory rat model, changes in bone tissue and cartilage, as well as the levels of cytokines and matrix metalloproteinases in the peripheral blood and directly in the joint tissue were studied. Their effectiveness has been shown in comparison with standard treatment.

Ревматоидный артрит (РА) относится к группе аутоиммунных заболеваний, поражает суставы и приводит к их полной иммобилизации. В России распространенность РА достигает 1 % населения, чаще заболевают женщины. Факторами развития заболевания являются генетическая предрасположенность, инфекционные заболевания, дисбактериозы и др. Ведущую роль в развитии РА играют провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли α (ФНО), интерлейкин (ИЛ) 6 и др.) Они активируют синтез других цитокинов, в том числе матриксных металлопротеиназ (ММП), привлекают к месту повреждения иммунокомпетентные клетки, поддерживая активный очаг воспаления [1].

Стандартным лечением РА является применение нестероидных противовоспалительных средств, цитостатиков, а также генно-инженерных препаратов, таких как антитела к провоспалительным цитокинам. Мы предлагаем использовать для блокировки синтеза цитокинов антисмысловые олигонуклетиды (АСО), вводя их непосредственно в область пораженного сустава. Это позволяет избежать системных эффектов, не затрагивает иммунную систему организма и не оказывает токсического воздействия на почки и печень.

Целью исследования стало изучение гистологических особенностей костной ткани в модели адъювант-индуцированного артрита, а также экспрессии ММП 1 и 3 в ткани и крови после применения АСО.

Материалы и методы

У самок крыс линии Wistar моделировали артрит путем введения полного адъюванта Фрейнда в основание хвоста. Коррекцию проводили внутрибрюшинным введением тоцилизумаба или атезолизумаба, подкожным введением АСО против ИЛ6 и/или ФНО, введением АСО методом электрофореза. Через три месяца лечения хвосты отделяли для гистологического исследования и определения активности ММП методом иммуногистохимии. Одновременно получали кровь для определения активности ММП в сыворотке.

Результаты

На момент начала лечения гистологическая картина позвонков соответствовала первой стадии артрита. Вокруг позвонков и межпозвоночных дисков наблюдалась обильная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация. Наблюдались выраженная деформация пульпозного ядра и фиброзного кольца, проникновение воспалительного ин-

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-25-10056).

© И. О. Головкин, Г. В. Маслова, Н. Н. Пилявский, Т. П. Макалиш, 2024

фильтрата в волокнистую хрящевую ткань, дезорганизация хряща и костной ткани. Через три месяца состояние кости в отсутствие лечения соответствовало артриту третьей стадии. Наиболее явным признаком было появление эрозий кости и хряща. В межпозвоночных дисках встречались участки некроза. Применение различных схем лечения существенно затормозило развитие болезни.

Во всех группах в большей или меньшей степени сохранялась лимфоидная инфильтрация. При этом отсутствовали признаки эрозии как в кости, так и в хряще. После применения тоцилизумаба обнаруживались признаки дистрофии в хондроцитах пульпозного ядра и гиалинового хряща. Состояние кости и хряща после применения АСО как по отдельности, так и в комбинации, не имело существенных отличий в сравнении с группой тоцилизумаба, а хрящевая ткань сохранилась лучше.

Экспрессия матриксных металлопротеиназ 1 и 3 в клетках хрящей и инфильтрата отражала активность перестройки костной и хрящевой ткани поврежденных позвонков. Уровень ММП3 в крови и ее активность в ткани коррелировали между собой. Наибольшая ее активность была в группе без коррекции, наименьшая — в группе с применением комбинации АСО методом электрофореза. Такая же корреляция была и для ММП1, с тем лишь отличием, что минимальная ее активность наблюдалась в группе с блокатором ФНО. Экспрессия ФНО оставалась достаточно высокой в периферической крови и для лимфоцитов инфильтрата во всех группах, тогда как в ткани в группах с блокатором ФНО в чистом виде и в комбинации активность данного цитокина снижалась.

Заключение

Применение антисмысловых олигонуклеотидов замедляет развитие воспаления, а также препятствует резорбции костной ткани в поврежденных костях. Наиболее эффективны в этом оказались инъекции АСО, блокирующего ИЛ-6: они привели к снижению уровня всех трех ММП практически к контрольным значениям, максимально сохранив структуру кости и хряща. Комбинация двух АСО показала себя наиболее эффективной в снижении активности матриксных металлопротеиназ, реорганизующих внеклеточный матрикс кости при РА, а также снижение синтеза ФНОα. Электрофоретический способ введения препарата не только менее инвазивен, но и сам по себе улучшает гемодинамику в области повреждения и снижает воспаление.

Можно заключить, что применение АСО для коррекции модели ревматоидного артрита является сопоставимым по эффекту со стандартной терапией, останавливая резорбцию кости путем снижения активности остеокластов и продукции ими матриксных металлопротеиназ.

Литература

1. Fonseca J. E., Cavaleiro J., Teles J. et al. Contribution for new genetic markers of rheumatoid arthritis activity and severity: sequencing of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter // Arthritis Research & Therapy. 2007. Vol. 9. R37. https://doi.org/10.1186/ar2173.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-311

СТРЕПТОЗОТОЦИН-НИКОТИНАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2-ГО ТИПА СНИЖАЕТ ОБОНЯТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КРЫС *

TYPE 2 DIABETES INDUCED BY STREPTOZOTOCIN AND NICOTINAMIDE REDUCES OLFACTORY FUNCTION IN RATS

А. В. Горская

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

A. V. Gorskaya

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ anna.v.gorskaya@gmail.com

Аннотация

Изучили влияние стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного сахарного диабета II типа на обонятельную функцию у крыс линии Wistar. Для оценки обонятельной функции использовались поведенческие тесты: тест поиска пищевых объектов и тест на предпочтение запахов. Согласно результатам исследования, сахарный диабет 2-го типа (СД2) у крыс приводит к развитию гипосмии, главным образом оказывая влияние на основную обонятельную систему.

Abstract

The effect of type 2 diabetes induced by streptozotocin and nicotinamide on olfactory function in Wistar rats was studied. The following behavioral tests were used to assess olfactory function: the buried food-seeking test and the odor preference test. According to the study results, type 2 diabetes in rats leads to the development of hyposmia, mainly affecting the primary olfactory system.

Согласно исследованиям, среди пациентов с сахарным диабетом 2 типа (СД2) широко распространены случаи снижения обоняния [1]. В качестве возможных причин снижения обоняния (гипосмии) при СД2 называют макро- или микрососудистые изменения, прямое повреждение обонятельного нерва из-за центральной диабетической невропатии, нейрональную патологию в пириформной коре (ПК), влияющую на дифференцировку незрелых нейронов в ПК и изменяющую экспрессию белка ГАМКергических интернейронов и другие причины [2–4]. Гипосмия проявляется в снижении способности распознавать запахи, ухудшении памяти на них и снижении нейронной пластичности, необходимой для создания новых нейронных связей и кодирования запахов. При этом данные о развитии гипосмии у экспериментальных моделей СД2 на грызунах немногочисленны и противоречивы.

Целью работы было исследование обонятельной функции на никотин-стрептозотоциновой модели СД2 у крыс.

Для эксперимента 25 крыс-самцов линии Wistar массой 300–350 г, разделили на две группы: 1 — контроль (10 крыс) и 2 — СД2 (15 крыс). Для воспроизведения СД2 крысам поочередно внутрибрюшинно вводились никотинамид (230 мг/кг) и стрептозотоцин (65 мг/кг) с интервалом в 15 минут. Крысам из контрольной группы внутрибрюшинно вводился физиологический раствор (0,9 %, NaCl). Для оценки развития СД2 проводили глюкозотолерантный тест (ГТТ) на 2 и 8 неделе после начала эксперимента, а также измеряли уровни случайной глюкозы и постпрандиального инсулина.

Для оценки обоняния использовали тест поиска пищевых объектов и тест на предпочтение одорантов. В тесте поиска пищевых объектов крысу после 24-часовой пищевой депривации помещали на 15 минут в камеру с 16 отверстиями в полу, заполненными опилками, в два из которых прятали по кусочку овсяного печенья. Результативность поиска оценивали по количеству обнаруженных кусочков, времени их нахождения и числу обнюхиваний всех отверстий.

Для теста на предпочтение запахов крыс помещали в круглую камеру, по периметру которой находились стеклянные плошки, содержащие по 2 мл эфирных масел апельсина, гвоздики, жасмина, мяты, эвкалипта, полыни, лаванды или валерианы, содержащей изовалериановую кислоту, считающуюся феромонным миметиком [5]. Оценивали количество подходов крысы к валериане и к остальным одорантам.

По данным ГТТ, у крыс с СД2 значение $AUC_{0\text{-}120}$ возрастало в 1,7 раз по сравнению со значением в контрольной группе. Уровни глюкозы в крови натощак у контрольных и СД2 крыс не различались. Уровни постпран-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

© А. В. Горская, 2024

диального инсулина в обеих группах не различались, в то время как уровень случайной глюкозы в СД2 группе превышал таковой у животных 1 группы.

По итогам теста поиска пищевых объектов крысам с СД2 требовалось в 2,3 раза больше времени на поиск печенья, чем крысам из 1 группы. Результативность поиска у контрольной группы в 1,8 раз превышала таковую у группы с индуцированным диабетом 2 типа. При этом количество обнюхиваний всех отверстий в полу камеры у обеих групп не различалось.

По результатам теста на предпочтение запахов у крыс с СД2 изменились предпочтения в выборе одорантов, не являющихся миметиками феромона (апельсин, гвоздика, жасмин, мята, эвкалипт, полынь, лаванда), в то время как предпочтение феромонного миметика (валерианы) перед другими одорантами сохранилось.

Таким образом, тест поиска пищевых объектов показал, что развитие СД2 у крыс влияет на обоняние. Это позволяет предположить, что для данной модели СД2 на крысах характерно развитие гипосмии. Результаты теста на предпочтение показывают, что СД2 преимущественно влияет на основную обонятельную систему, нежели на дополнительную, отвечающую главным образом за восприятие феромонов.

Литература

1. Sivakumar R., White J., Villwock J. Olfactory dysfunction in type II diabetes: Therapeutic options and lessons learned from other etiologies-A scoping review // Primary care diabetes. 2022. Vol. 16(4). P. 543–548.

2. Gouveri E., Katotomichelakis M., Gouveris H. et al. Olfactory dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an additional manifestation of microvascular disease? // Angiology. 2014. Vol. 65(10). P. 869–876.

3. Lietzau G., Davidsson W., Östenson C. G. et al. Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity; effects partly reversed by the DPP-4 inhibitor Linagliptin // Acta neuropathologica communications. 2018. Vol. 6. P. 1–15.

4. Várkonyi T., Koerei A., Putz Z. et al. Olfactory dysfunction in diabetes: a further step in exploring central manifestations of neuropathy? // Angiology. 2014. Vol. 65(10). P. 857–860.

5. Pause B. M. Are androgen steroids acting as pheromones in humans? // Physiology & behavior. 2004. Vol. 83(1). P. 21–29.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-312

ФЕБРИЛЬНЫЕ СУДОРОГИ ВЫЗЫВАЮТ НАРУШЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС, СОПРОВОЖДАЮЩИЕСЯ УХУДШЕНИЕМ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ

FEBRILE SEIZURES CAUSE IMPAIRED SYNAPTIC PLASTICITY IN THE RAT HIPPOCAMPUS ACCOMPANIED BY IMPAIRMENT OF SPATIAL MEMORY

А. В. Грифлюк, Т. Ю. Постникова, А. В. Зайцев

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

A. V. Griflyuk, T. Y. Postnikova, A. V. Zaitsev

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ Griflyuk.Al@mail.ru

Аннотация

Фебрильные судороги (ФС) приводят к задержке морфофункционального созревания гиппокампа крыс. Долговременная потенциация (ДВП) у крыс после ФС в возрасте 21 день снижена и напоминает характеристики ДВП у крыс в 12 дней. Эти нарушения сопровождаются замедлением морфологического развития астроцитов. В возрасте 2 месяцев у крыс после ФС нарушены пространственное обучение и память в лабиринте Барнса.

Abstract

Febrile seizures (FSs) result in delayed morphofunctional maturation of the rat hippocampus. Long-term potentiation (LTP) in rats after FSs at 21 days of age is reduced and resembles the characteristics of LTP in rats at 12 days of age. These abnormalities are accompanied by delayed morphological development of astrocytes. At 2 months of age, spatial learning and memory in the Barnes maze are impaired in FSs rats.

Фебрильные судороги (ФС) — распространенное неврологическое нарушение раннего возраста [1]. Как и многие негативные факторы, действующие на ранних стадиях развития, ФС могут привести к нарушениям нормального развития мозга и, в частности, гиппокампа, одной из наиболее уязвимых структур при данной патологии.

Цель исследования — изучение морфологических и функциональных изменений в гиппокампе крыс разных возрастов после перенесенных ФС.

Исследование проведено на самцах крыс Wistar. В возрасте 10 дней крыс на 30 минут помещали на дно стеклянной камеры, где с помощью потока теплого воздуха поддерживали температуру 46 °C. В таких условиях повышается температура тела животных и развиваются ФС. Животные контрольной группы гипертермии не подвергались.

Электрофизиологические исследования включали в себя изучение долговременной потенциации (ДВП) на переживающих срезах мозга (400 мкм) животных трех возрастных групп: 12, 21 и 55 дней. Полевые возбуждающие постсинаптические потенциалы (пВПСП) отводили от радиального слоя поля CA1 гиппокампа. ДВП индуцировали высокочастотной электрической стимуляцией. Регистрацию пВПСП после стимуляции производили в течение часа. Гистологические исследования проведены на фронтальных срезах мозга толщиной 20 мкм, полученных с использованием криотома. Непрямым иммуногистохимическим методом определяли экспрессию кислого глиального фибриллярного белка GFAP в двух областях гиппокампа: CA1 и CA3. У крыс в возрасте 55 дней, используя лабиринт Барнса, оценили пространственную память после ФС. Задача лабиринта Барнса — в течение 4-дневного обучения крысам надо запомнить местонахождение норки, расположенной под одним из отверстий круглой платформы. На 5-й день проводится тестовое задание, при котором норка переставляется в другое место, и оценивается время, которое крыса провела в целевой зоне (в зоне нахождения норки во время обучения).

У животных и контрольной, и экспериментальной групп в возрасте 12 дней ДВП нестабильна и постепенно снижается через полчаса после индукции, что характерно для данного возраста (1,23 ± 0,06 и 1,09 ± 0,08 соответственно). У животных после ФС в возрасте 21 и 55 дней ДВП достоверно снижена по сравнению с контрольной группой (21 день: контроль — 1,61 ± 0,09, ФС — 1,27 ± 0,07, $p < 0,05$; 55 дней: контроль — 1,61 ± 0,11,

© А. В. Грифлюк, Т. Ю. Постникова, А. В. Зайцев, 2024

ФС — 1,22 ± 0,09, $p < 0,05$). Также у животных экспериментальной группы в возрасте 21 день ДВП нестабильна, т. е. ход кривой ДВП после стимуляции такой же, как у животных 12 дней.

У животных после гипертермии с ФС в возрасте 12 дней процент площади, занимаемой GFAP-положительными объектами, не отличается от значений контрольной группы (CA1: контроль — 6,0 ± 0,9 %, ФС — 7,5 ± ± 1,0; CA3: контроль — 4,3 ± 0,9 %, ФС — 5,9 ± 1,0). Но к 21 дню жизни у контрольных животных данное значение увеличивается (CA1: 9,0 ± 0,9 %; CA3: 7,5 ± 0,9 %), что связано с морфологическими изменениями астроцитов в период развития нервной системы. При этом у экспериментальных животных площадь, занимаемая GFAP-положительными объектами, меньше, чем у контрольных животных (CA1: 6,0 ± 0,8 %; CA3: 4,3 ± 0,6 %, $p < 0,05$).

В лабиринте Барнса животным после ФС требовалось больше времени для успешного нахождения норки в процессе 4-дневного обучения, а также по сравнению с контрольной группой экспериментальные животные хуже справлялись с тестовым заданием после окончания обучения.

Полученные данные свидетельствуют, что у крыс после ФС наблюдается задержка функционального созревания гиппокампа: у крыс в возрасте 21 день характеристики ДВП такие же, как у животных в 12 дней. Эти изменения сопровождаются замедлением морфологического развития астроцитов. Через полтора месяца после ФС у крыс наблюдается нарушение пространственной памяти.

Литература

1. Leung A. K., Hon K. L., Leung T. N. Febrile seizures: An overview // Drugs in Context. 2018; 7: 212536.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-313

КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ НЕОНАТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НЕОПИАТНОГО АНАЛОГА ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА В МИОКАРДЕ ИНФАНТИЛЬНЫХ САМОК БЕЛЫХ КРЫС С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ВНУТРИУТРОБНЫМ ПЕРИОДОМ, ПОДВЕРГНУТЫХ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF NEONATAL ADMINISTRATION OF NON-OPIATE ANALOGUE OF LEU-ENKEPHALIN IN MYOCARDIUM OF PREMATURE ALBINO RAT FEMALES WITH AN ADVERSE INTRAUTERINE PERIOD, EXPOSED TO ACUTE HYPOXIA

И. А. Гусев

Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск

I. A. Gusev

The Far Eastern State Medical University, Khabarovsk

✉ gusilia99@mail.ru

Аннотация

Изучена реакция кардиомиоцитов и мастоцитов сердца инфантильных самок белых крыс на острую гипоксию (46-е сутки жизни), подвергнутых внутриутробной гипоксии (15–19 сутки гестации) и неонатальному введению неопиатного аналога лей-энкефалина (пептид НАЛЭ, Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, 100 мкг/кг). Долгосрочный кардиопротективный эффект НАЛЭ в миокарде с неблагоприятным внутриутробным периодом после острой гипоксии частично зависит от системы NOS-NO.

Abstract

The reaction of cardiomyocytes and heart mastocytes of premature albino rat females, exposed to intrauterine hypoxia (15–19 gestation days) and neonatal administration of non-opiate analogue of leu-enkephalin (NALE peptide, Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg, 100 μg/kg), to acute hypoxia (46th day of postnatal life) was studied. The long-term cardioprotective effect of NALE in the myocardium with an adverse intrauterine period partially depends on NOS-NO system.

Введение

Внутриутробная гипоксия (ВУГ) — осложнение 10 % всех беременностей и причина перинатальных потерь в 40 % случаев [1]. Высокая чувствительность кардиомиоцитов (КМЦ) к уровню оксигенации определяет повышенную уязвимость миокарда к ВУГ [2]. ВУГ индуцирует кардиальную патологию новорожденных, а также формирует чувствительный к ишемии фенотип КМЦ благодаря эпигенетической активности [3]. Миокард животных, подвергнутых ВУГ, демонстрирует негативные изменения реакции КМЦ и тучных клеток (ТК) сердца на острую постнатальную гипоксию [4].

Аналог лей-энкефалина — пептид НАЛЭ (Phe-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) корректирует ранние [5] и отдаленные кардиальные последствия ВУГ [6]. Неонатальное введение НАЛЭ повышает устойчивость КМЦ к острой гипоксии во взрослом возрасте [7]. Вместе с тем эффекты НАЛЭ на постгипоксическую реакцию миокарда с анамнезом ВУГ недостаточно изучены.

Цель исследования — анализ реакции миокарда инфантильных самок белых крыс, подвергнутых ВУГ и неонатальному введению неопиатного аналога лей-энкефалина, на острую гипоксию.

Материалы и методы

Потомство самок белых крыс Wistar, подвергнутых гипобарическому воздействию (15–19 день гестации, pO_2 = 55 мм рт. ст., экспозиция 4 часа), получало со 2-х по 6-е сутки жизни внутрибрюшинное введение пептида НАЛЭ в дозе 100 мкг/кг, а также введение НАЛЭ в сочетании с блокатором NO-синтазы L-NAME (50 мг/кг), после чего подвергалось однократному гипоксическому воздействию на 46-е сутки жизни и выводилось из эксперимента. Животные контрольной группы и группы сравнения получали эквиобъемное количество 0,9 % NaCl.

Нуклеолярный аппарат КМЦ оценивали при световой микроскопии (увеличение 10 × 100) при подсчете количества ядрышек в миокарде левого и правого желудочков в срезах, окрашенных по методу AgNOR. Количество ТК сердца анализировали при окраске срезов сердца по Шубичу.

© И. А. Гусев, 2024

Результаты

В группе «ВУГ + ОГ» выявлено достоверное снижение среднего количества ядрышек в миокарде обоих желудочков сердца за счет значимого уменьшения доли КМЦ с 4 ядрышками; отмечено достоверное снижение общего количества ТК в эпикарде правого желудочка. Неонатальное введение пептида НАЛЭ значимо увеличивало среднее количество ядрышек по сравнению с группой «ВУГ + ОГ» в левом желудочке и долю КМЦ с 4 ядрышками — в правом желудочке. Число ТК при введении НАЛЭ достоверно от контроля не отличалось. Блокада NO-синтазы нивелировала часть эффектов НАЛЭ — среднее количество ядрышек и число 4-ядрышковых КМЦ достоверно уменьшались по сравнению с контролем. Вместе с тем в группе «ВУГ + НАЛЭ + L-NAME + + ОГ» не выявлено статистически значимых отличий количества ТК от контроля, аналогично группе «ВУГ + + НАЛЭ + ОГ».

Таким образом, неонатальное введение пептида НАЛЭ повышает устойчивость миокарда с неблагоприятным внутриутробным периодом к постнатальной гипоксии. Эффекты пептида частично определяются взаимодействием с системой оксида азота (NOS-NO).

Литература

1. Радзинский В. Е., Костин И. Н., Лаврова Н. Ю. Интранатальные факторы риска и неонатальные исходы // Вестник новых медицинских технологий. 2010. № 7. С. 73–75.

2. Giussani D. A., Davidge S. T. Developmental programming of cardiovascular disease by prenatal hypoxia // J. Dev. Orig. Health. Dis. 2013. Vol. 4. P. 328–337.

3. Patterson A. J., Zhang L. Hypoxia and Fetal Cardiac Development // Curr. Mol. Med. 2010. Vol. 10. P. 653–666.

4. Ланшакова А. В., Гусев И. А., Сазонова Е. Н. Особенности реакции на острую гипоксию миокарда белых крыс с неблагоприятным антенатальным периодом // Актуальные вопросы современной медицины: Материалы VII Дальневосточного медицинского молодежного форума, Хабаровск, 02–14 октября 2023 года. Хабаровск: Дальневосточный государственный медицинский университет, 2023. С. 274–277.

5. Sazonova E. N., Lebedko O. A., Tsymbalist N. A., Gusev I. A., Samarina E. Yu. The role of amino acid arginine and nitric oxide system in implementing cardioprotective effect of non-opioid analogue of leu-enkephalin in newborn albino rats after intrauterine hypoxia // Russian Open Medical Journal. 2020. Vol. 9(4). P. 404.

6. Гусев И. А., Малофей Ю. Б., Сазонова Е. Н. Влияние неонатального введения неопиатных аналогов лей-энкефалина на отдаленные кардиальные последствия внутриутробной гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2024. Т. 177(5). С. 568–574.

7. Сазонова Е. Н., Гусев И. А., Малофей Ю. Б., Ланшакова А. В., Вдовенко С. В. Влияние неонатального введения неопиатных аналогов лей-энкефалина на показатели тканевого гомеостаза сердца белых крыс препубертатного возраста, подвергнутых гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 173 (2). С. 158–163.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-314

НОВЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ*

NEW METHODS FOR MORPHOLOGICAL DIAGNOSTICS

В. В. Гусельникова, О. В. Кирик, И. А. Никитина, В. А. Разенкова,
Е. А. Федорова, В. С. Павлова, Д. Э. Коржевский

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

V. V. Guselnikova, O. V. Kirik, I. A. Nikitina, V. A. Razenkova, E. A. Fedorova, V. S. Pavlova, D. E. Korzhevskii

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg

✉ Guselnicova.Valeriia@yandex.ru

Аннотация

Работа посвящена разработке новых и совершенствованию существующих методов и подходов для морфологических медико-биологических исследований. Применение предложенных разработок может способствовать выяснению механизмов патогенеза и повышению точности диагностики ряда социально значимых заболеваний, таких как амилоидная кардиомиопатия, болезнь Альцгеймера, инфаркт миокарда, фиброз печени.

Abstract

The work is devoted to the development and improvement of methods and approaches for morphological biomedical research. The use of this methods can help clarify the pathogenetic mechanisms and improve diagnostic accuracy of socially significant diseases, such as amyloid cardiomyopathy, Alzheimer's disease, myocardial infarction, and liver fibrosis.

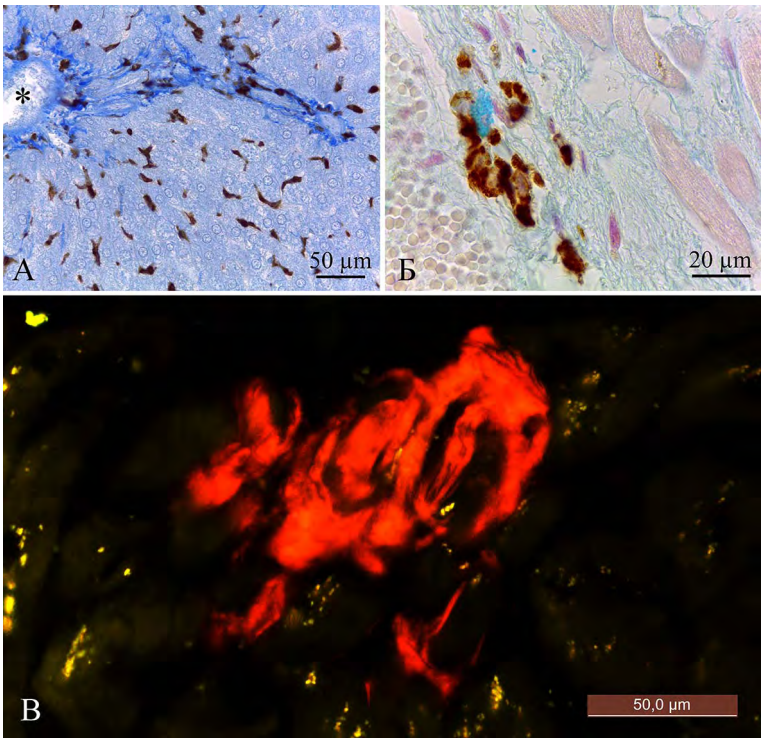
Среди современных научно-исследовательских и клинико-диагностических методов морфологические методы по праву занимают одно из ключевых мест благодаря своей высокой информативности и диагностическому значению. В Отделе общей и частной морфологии ФГБНУ «ИЭМ» нами ведется работа по разработке новых и совершенствованию существующих методов и подходов для морфологических медико-биологических исследований.

Нами был разработан **новый комбинированный метод выявления клеток Купфера и коллагеновых волокон соединительной ткани** на гистологических срезах печени (заявка на патент № 2024118992 от 16.07.2024). Клетки Купфера являются резидентными макрофагами печени и выполняют защитную функцию, фагоцитируя чужеродные частицы, молекулы эндотоксинов, поврежденные эритроциты и апоптотические гепатоциты. Доказанная способность клеток Купфера влиять на состояние коллагеновых волокон соединительной ткани, а также ключевая роль этих двух компонентов печени в развитии фиброза делает высоко актуальным их совместный анализ. Разработанный нами комбинированный метод основан на использовании иммуногистохимической реакции на кальций-связывающий белок Iba1 для идентификации клеток Купфера и последующей гистохимической окраски препаратов раствором красителя анилинового синего для выявления коллагеновых волокон соединительной ткани. При проведении световой микроскопии иммунопозитивные клетки, локализованные в синусоидах печени, являются клетками Купфера (см. рисунок, *А*, коричневый цвет); коллагеновые волокна соединительной ткани окрашены в насыщенный синий цвет (см. рисунок, *А*, синий цвет).

С целью визуализации и оценки структурно-функционального состояния тучных клеток и макрофагов сердца в норме и при развитии сердечно-сосудистой патологии нами был разработан **новый метод одновременного выявления макрофагов и тучных клеток в миокарде** (заявка на патент № 2022121803/14 от 09.08.2022). Тучные клетки и макрофаги являются важными регуляторами тканевого гомеостаза, а также ключевыми участниками воспалительных реакций, вносящими существенный вклад в патогенез сердечно-сосудистых заболеваний. Предложенный нами метод основан на использовании иммуногистохимической реакции на специфический маркер макрофагов CD68 и последующей гистохимической окраске препаратов раствором красителя альцианового синего для визуализации тучных клеток. При проведении световой микроскопии препаратов клетки, окрашенные в коричневый цвет, являются макрофагами, тучные клетки и их гранулы окрашиваются в насыщенный бирюзовый цвет (см. рисунок, *Б*).

* Исследование выполнено за счет средств государственного задания ФГБНУ «ИЭМ» № 075-03-2024-598.

© В. В. Гусельникова, О. В. Кирик, И. А. Никитина, В. А. Разенкова, Е. А. Федорова, В. С. Павлова, Д. Э. Коржевский, 2024



Результаты применения разработанных методов и подходов
в лабораторной практике

Для улучшения качества морфологической диагностики амилоидозов нами была предложена **новая технология выявления амилоида в тканях**, основанная на использовании нового флуоресцентного зонда ДСНАФ (динатриевая соль 2,7-(1-амино-4-сульфо-2-нафтилазо)флуорена) (патент на изобретение № 2673815 от 30.11.2017). Амилоидозы представляют собой гетерогенную группу заболеваний, связанных с отложением в тканях неправильно сложенных белков — амилоидов. Наиболее надежным способом диагностики амилоидозов в настоящее время считается биопсия с последующим гистологическим исследованием образцов тканей с использованием красителя Конго красного. Синтезированный на основе флуорена аналог Конго красного — ДСНАФ — по специфичности и интенсивности окрашивания амилоида сопоставим с Конго красным, а по интенсивности флуоресценции при связывании с амилоидными фибриллами значительно его превосходит (рис. В, красная флуоресценция). Это особенно важно для идентификации малых скоплений амилоида в тканях человека, что актуально при исследовании биопсийного материала.

Все представленные методы и подходы отличаются высокой селективностью, относительной простотой реализации, экономичностью и доступностью. Они могут быть использованы для исследования как только подготовленного, так и архивного материала, хранящегося в парафиновых блоках. Методы эффективны при работе с тканями лабораторных животных и человека. Использование предложенных разработок в практике научно-исследовательских, патоморфологических и клинико-диагностических лабораторий может способствовать выяснению механизмов патогенеза и повышению точности диагностики ряда социально значимых заболеваний, таких как амилоидная кардиомиопатия, болезнь Альцгеймера, инфаркт миокарда, фиброз печени. Это обуславливает важность представленных разработок для медико-биологической отрасли.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-315

СПЛАЙСИНГОВЫЕ ВАРИАНТЫ В ЭТИОЛОГИИ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ВАРИАНТЫ В ГЕНЕ *SLC26A4*, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОТЕРЕЙ СЛУХА [*]

SPLICING VARIANTS IN THE ETIOLOGY OF MONOGENIC DISEASES: VARIANTS IN THE *SLC26A4* GENE ASSOCIATED WITH HEARING LOSS

В. Ю. Данильченко, Е. А. Панина, М. В. Зыцарь, Е. А. Маслова, К. Е. Орищенко, О. Л. Посух

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
Новосибирский государственный университет

V. Yu. Danilchenko, E. A. Panina, M. V. Zytsar, E. A. Maslova, K. E. Orishchenko, O. L. Posukh

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk
Novosibirsk State University

✉ danilchenko_valeri@mail.ru

Аннотация

Роль генетических вариантов, потенциально нарушающих сплайсинг, в развитии наследственных заболеваний пока недооценена. Функциональная оценка таких вариантов в системах *in vitro* является актуальной задачей для постановки правильного диагноза. Представлены первые результаты *in vitro* анализа функциональных эффектов новых вариантов гена *SLC26A4*, ассоциированных с потерей слуха, с использованием генетических конструкций-минигенов.

Abstract

The role of genetic variants that potentially disrupt splicing in the development of hereditary diseases is still underestimated. Functional assessment of such variants in *in vitro* systems is an important task for establishing a correct diagnosis. The first results of *in vitro* analysis of the functional effects of new variants in the *SLC26A4* gene associated with hearing loss using minigene splicing assay are presented in this study.

С развитием новейших методов секвенирования генома стремительно возрастает объем информации о возможных ассоциациях различных вариантов генов с моногенными заболеваниями. В связи с этим интерпретация обнаруженных вариантов в контексте их потенциальной роли в этиологии наследственных заболеваний и экспериментальная верификация их патогенного статуса является актуальной задачей для молекулярной диагностики. В настоящее время известно, что доля вариантов, негативно влияющих на нормальный процесс сплайсинга, составляет не менее 15 % от числа всех патогенных вариантов, но, вероятно, их роль в возникновении наследственных заболеваний является недооцененной [1]. Оценки *in silico* возможного влияния варианта на сплайсинг, полученные с помощью различных компьютерных предсказательных программ, часто противоречивы и недостаточны для клинических и диагностических целей. В связи с этим для подтверждения предсказанного функционального эффекта анализируемых вариантов необходимо проводить экспериментальные исследования *in vitro*. Одним из наиболее эффективных подходов к *in vitro* оценке функциональных эффектов вариантов, потенциально влияющих на процесс сплайсинга, является экспериментальный метод с использованием минигенов (minigene splicing assay). Суть этого метода заключается в том, что амплифицированный фрагмент анализируемого гена (экзон/экзоны вместе с фрагментами, фланкирующими их интронов) клонируется в специальную экспрессирующую плазмиду. Миниген-конструкция трансфецируется в клетки, где с нее экспрессируется мРНК, и анализ сплайсинга проводится методом ПЦР с обратной транскрипцией. Сравнение продуктов ПЦР (размер и нуклеотидная последовательность), полученных с использованием минигенов, содержащих фрагменты с диким типом или анализируемым вариантом, позволяет сделать вывод о его эффекте на процесс сплайсинга. Этот подход особенно эффективен при невозможности анализа РНК, выделенной из соответствующей ткани пациента, ввиду частой недоступности такого биологического материала.

Потеря слуха, вызываемая генетическими и средовыми причинами, является актуальной медико-социальной проблемой, поскольку затрагивает более 5 % населения мира и существенно снижает качество жизни боль-

[*] Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 24-75-00029).

© В. Ю. Данильченко, Е. А. Панина, М. В. Зыцарь, Е. А. Маслова, К. Е. Орищенко, О. Л. Посух, 2024

ных. Несиндромальная наследственная глухота, являясь моногенным заболеванием, характеризуется уникальной генетической гетерогенностью: патогенные варианты множества генов (идентифицировано не менее 140 «генов глухоты») приводят к различным типам потери слуха. Патогенные варианты в гене *SLC26A4* (solute carrier family 26, member 4, 7q22.3, OMIM 605646) являются одной из наиболее значимых причин возникновения глухоты во многих популяциях мира.

Ген *SLC26A4* (21 экзон), кодирующий трансмембранный транспортный белок пендрин (pendrin), экспрессируется в тканях внутреннего уха, щитовидной железы и почек. Во внутреннем ухе пендрин участвует в транспорте анионов, поддерживая ионный гомеостаз эндолимфы. Нарушение структуры и функций пендрина вследствие мутационных изменений в гене *SLC26A4* может приводить к частичной или полной потере слуха. Известно несколько сотен патогенных вариантов гена *SLC26A4*, ассоциированных с потерей слуха, среди которых существенную долю (не менее 25 %) составляют варианты (интронные и экзонные), по-видимому, приводящие к нарушению процесса сплайсинга. Но потенциальный повреждающий эффект на сплайсинг для многих из них был оценен только с помощью компьютерных предсказательных программ, а экспериментальные исследования таких вариантов все еще немногочисленны.

Целью данной работы является изучение потенциальных эффектов на сплайсинг вариантов гена *SLC26A4*, которые впервые были обнаружены в ходе исследований генетических форм потери слуха у коренного населения Республик Тыва и Алтай (Южная Сибирь) [2, 3]. В работе будут представлены первые результаты по созданию модельных систем *in vitro* с использованием генетических конструкций-минигенов для исследования функциональных эффектов ряда глубокоинтронных вариантов, локализованных вне канонических сайтов сплайсинга, а также варианта c.1545T>G, локализованного на экзон-интронной границе (1-я нуклеотидная позиция экзона 14), то есть в потенциально «чувствительной» для «правильного» сплайсинга позиции. В случае подтверждения патогенного статуса анализируемых *SLC26A4*-вариантов, они могут быть включены в тестовые панели для молекулярной диагностики наследуемых форм потери слуха.

Литература

1. Abramowicz A., Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation // J. Appl. Genet. 2018. Vol. 59(3). P. 253–268.

2. Данильченко В.Ю., Зыцарь М.В., Маслова Е.А., Бады-Хоо М.С., Морозов И.В., Бондарь А.А., Посух О.Л. Анализ мутационного спектра гена *SLC26A4* и его вклада в этиологию наследуемой потери слуха у коренного населения Южной Сибири // Медицинская генетика. 2020. Т. 19. № 7(216). С. 43–45.

3. Danilchenko V. Yu., Zytsar M.V., Maslova E.A., Bady-Khoo M.S., Barashkov N.A., Morozov I.V., Bondar A.A., Posukh O.L. Different Rates of the *SLC26A4*-Related Hearing Loss in Two Indigenous Peoples of Southern Siberia (Russia) // Diagnostics. 2021. Vol. 11. P. 2378.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-316

ВОЗДЕЙСТВИЕ ХЛОРИДА КАДМИЯ В ТЕЧЕНИЕ 48 И 72 ЧАСОВ ВЛИЯЕТ НА МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК HEPG2 И HEK293*

CADMIUM CHLORIDE EXPOSURE FOR 48 AND 72 HOURS AFFECTS THE MITOTIC ACTIVITY OF HEPG2 AND HEK293 CELLS

Н. И. Дергачева, И. О. Сучкова, Л. К. Сасина, Е. Л. Паткин

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург

N. I. Dergacheva, I. O. Suchkova, L. K. Sasina, E. L. Patkin

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg

✉ natalia-9999@mail.ru

Аннотация

Работа посвящена исследованию влияния малых доз хлорида кадмия на пролиферативную активность клеток человека HepG2 и HEK29.

Abstract

The work is devoted to the study of the effect of the small doses of cadmium chloride on the proliferative activity of human cells HepG2 and HEK29.

Введение

В токсикологических исследованиях методы оценки генотоксичности и цитотоксичности веществ с использованием культур клеток находят широкое применение, поскольку позволяют точно контролировать дозы и продолжительность воздействия, а также значительно сокращают продолжительность исследования.

Кадмий является одним из тяжелых металлов, оказывающих токсическое воздействие на живые организмы. Он обладает высокой кумулятивной активностью, канцерогенным и мутагенным действием. Растворимые соединения кадмия после всасывания в кровь поражают различные системы и органы, при этом основной «удар» приходится на печень и почки. Этот ксенобиотик затрагивает широкий спектр внутриклеточных процессов, в частности, клеточный цикл [1, 2, 3].

Цель — оценить влияние малых доз хлорида кадмия на митотическую активность клеток печени и почек человека.

Материалы и методы

Клетки HepG2 (карцинома печени) и HEK293 (трансформированные клетки почки эмбриона) культивировали в течение 24 ч до достижения 25–30 % конфлюентности. Затем в опытные образцы добавляли $CdCl_2$ (конечные концентрации — 0,5 мкМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ) и продолжали культивирование еще в течение 48 и 72 ч. За 2 ч до снятия культуры во флаконы вносили колхицин (конечная концентрация 0,2 мкг/мл). Гипотоническая обработка — 0,5 % KCl, 37 °C, 30 мин. Фиксатор — метанол:уксусная кислота (3:1). Микроскопию проводили с использованием фазово-контрастного микроскопа Axio Lab.A1 (объектив ×20, окуляр ×10). Вычисляли митотический индекс (МИ) — процент делящихся клеток от общего числа проанализированных клеток. МИ определяли на 5000 зарегистрированных клеток. Статистическую значимость различий между опытом и контролем оценивали с помощью таблицы сопряженности 2 × 2, используя критерий Хи^2-Пирсона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В линии HepG2 воздействие $CdCl_2$ в течение 48 ч привело к повышению митотической активности клеток в 2,4 раза при дозах 5 мкМ ($p < 0,001$) и 10 мкМ ($p < 0,001$), и в 1,5 раза — при 2 мкМ ($p < 0,001$). В последующие 24 ч эта тенденция сохранилась: МИ повышен в 1,7 раза при дозе 5 мкМ ($p < 0,001$), в 1,6 раза — при дозе 10 мкМ

* Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № FGWG-2022-0012.

© Н. И. Дергачева, И. О. Сучкова, Л. К. Сасина, Е. Л. Паткин, 2024

($p < 0,001$) и в 1,1 раза — при дозе 2 мкМ ($p = 0,004$). Однако в отличие от 48 ч воздействия через 72 ч инкубации клеток в присутствии $CdCl_2$ наблюдалось также и снижение МИ в 1,4 раза при дозах 0,5 мкМ и 1 мкМ ($p < 0,001$) по сравнению с контролем (табл. 1). В линии HEK293 воздействие $CdCl_2$ в течение 48 ч понизило МИ в 1,5 раза при дозе 1 мкМ ($p < 0,001$) и в 1,2 раза — при 10 мкМ ($p = 0,020$). В последующие 24 ч эта тенденция также сохранилась: МИ был снижен в 1,7 раза при дозе 1 мкМ ($p < 0,001$) и в 1,2 раза — при дозе 10 мкМ ($p = 0,014$), а также в 1,8 раза — для дозы 2 мкМ ($p < 0,001$) (табл. 2).

Таблица 1

Влияние $CdCl_2$ на митотическую активность клеток HepG2

Доза	Продолжительность воздействия			
	48 ч		72 ч	
	МИ, % (95% ДИ)	p^*	МИ, % (95% ДИ)	p^*
Контроль	1,99 (1,82–2,18)	–	3,53 (3,40–3,67)	–
0,5 мкМ	1,79 (1,56–2,05)	0,199	2,57 (2,32–2,85)	< 0,001
1 мкМ	1,77 (1,53–2,05)	0,170	2,54 (2,38–2,71)	< 0,001
2 мкМ	2,90 (2,56–3,29)	< 0,001	3,87 (3,69–4,06)	0,004
5 мкМ	4,69 (3,95–5,57)	< 0,001	5,93 (5,50–6,39)	< 0,001
10 мкМ	4,79 (4,01–5,71)	< 0,001	5,73 (5,26–6,24)	< 0,001

Таблица 2

Влияние $CdCl_2$ на митотическую активность клеток HEK293

Доза	Продолжительность воздействия			
	48 ч		72 ч	
	МИ, % (95% ДИ)	p^*	МИ, % (95% ДИ)	p^*
Контроль	3,53 (3,16–3,96)	–	2,91 (2,61–3,24)	–
0,5 мкМ	3,25 (2,92–3,61)	0,290	2,56 (2,28–2,88)	0,113
1 мкМ	2,31 (2,02–2,64)	< 0,001	1,73 (1,52–1,97)	< 0,001
2 мкМ	3,03 (2,74–3,35)	0,049	1,58 (1,38–1,81)	< 0,001
5 мкМ	3,21 (2,86–3,60)	0,242	2,72 (2,45–3,02)	0,374
10 мкМ	2,85 (2,47–3,29)	0,020	2,41 (2,17–2,68)	0,014

В ряде работ на многих типах клеток было отмечено, что кадмий влияет на репарационные процессы ДНК и клеточный цикл, как повышая, так и снижая пролиферативную активность [4], либо не оказывает на пролиферацию видимого эффекта [5] или даже «включает» адаптивные механизмы клеток [6].

Заключение

Полученные результаты указывают на то, что низкие дозы $CdCl_2$ влияют на клеточный цикл иммортализованных клеток печени (HepG2) и почек человека (Hek293) в зависимости от типа клеток, дозы токсиканта и продолжительности воздействия.

Литература

1. Малов А. М., Сибиряков В. К., Иваненко А. А. Накопление кадмия в некоторых органах и тканях крыс // Клиническая токсикология. 2013. Т. 14. С. 228–240.

2. Ахполова В. О., Брин В. Б. Современные представления о кинетике и патогенезе токсического воздействия тяжелых металлов // Вестник новых медицинских технологий. 2020. Т. 27. № 1. С. 55–61.

3. Fowler B. A. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. Vol. 238. P. 294–300.

4. Chen Y. Y., Zhu J. Y., Chan K. M. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells // Aquatic Toxicology. 2014. Vol. 157. P. 196–206.

5. Агбалян Е. В., Шинкарук Е. В. Характеристика генотоксических и цитотоксических эффектов малых доз кадмия // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015. № 6 (часть 3). С. 427–431.

6. Ye S., Yuan D., Xie Y. et al. Role of DNA methylation in the adaptive responses induced in a human B lymphoblast cell line by long-term low-dose exposures to γ-rays and cadmium // Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 2014. Vol. 773. P. 34–38.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-317

АНАКИНРА ВОССТАНАВЛИВАЕТ ФУНКЦИИ ПАМЯТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ СО СТРАХОМ, НО НЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

ANAKINRA RESTORES FEAR-ASSOCIATED MEMORY FUNCTION BUT NOT SPATIAL LEARNING AND MEMORY ABILITY IN RATS IN A LITHIUM-PILOCARPINE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

А. В. Дёмина, М. О. Грязнова, А. П. Шварц, А. В. Зайцев

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

A. V. Dyomina, M. O. Gryaznova, A. P. Schwarz, A. V. Zaitsev

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ adyomina513@gmail.com

Аннотация

В результате применения антагониста рецептора интерлейкина 1 (анакинра) после вызванного пилокарпином эпилептического статуса у крыс наблюдается коррекция поведенческих нарушений (гиперактивность, снижение исследовательской активности, ангедония) и памяти, ассоциированной со страхом, в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели. Однако на нарушения пространственной гиппокамп-зависимой памяти применение анакинры не повлияло.

Abstract

Interleukin 1 receptor antagonist (anakinra) administration after pilocarpine-induced status epilepticus in rats resulted in correction of behavioral disturbances (hyperactivity, decreased exploratory activity, anhedonia) and fear-associated memory in the chronic phase of the lithium-pilocarpine model. However, spatial hippocampus-dependent memory impairments were not affected by anakinra administration.

Височная эпилепсия — хроническое заболевание головного мозга, характеризующееся стойкой предрасположенностью к спонтанным судорожным припадкам, начинающимся с пароксизмальной активности в височной доле. Височная эпилепсия трудно поддается лечению, поэтому в качестве перспективного метода рассматривается превентивная терапия с помощью контроля нейровоспаления в группах риска развития эпилепсии. Поскольку для мезиальной височной эпилепсии характерны сопутствующие психоэмоциональные и когнитивные нарушения, на которые может влиять противосудорожная терапия.

Целью данной работы стала оценка поведенческих нарушений в литий-пилокарпиновой модели (ЛПМ) после применения антагониста рецептора интерлейкина 1 (IL-1Ra).

После инициации эпилептического статуса (SE) по описанной ранее методике [1] животных случайным образом делили на 2 группы и вводили физ. р-р (группа ЛПМ) или анакинру (100 мг/кг, IL-1Ra, Гос. НИИ ОЧБ — группа ЛПМ + А) через час после остановки судорог и затем в течение 10 дней один раз в сутки. Контрольные крысы получали LiCl и физ. р-р. Все инъекции производились внутрибрюшинно. В хроническую фазу модели (начиная с 7 недель после SE) поведенческие нарушения оценивали в тестах открытое поле, распознание нового объекта, предпочтение раствора сахарозы, лабиринт Барнс и условно-рефлекторное замирание.

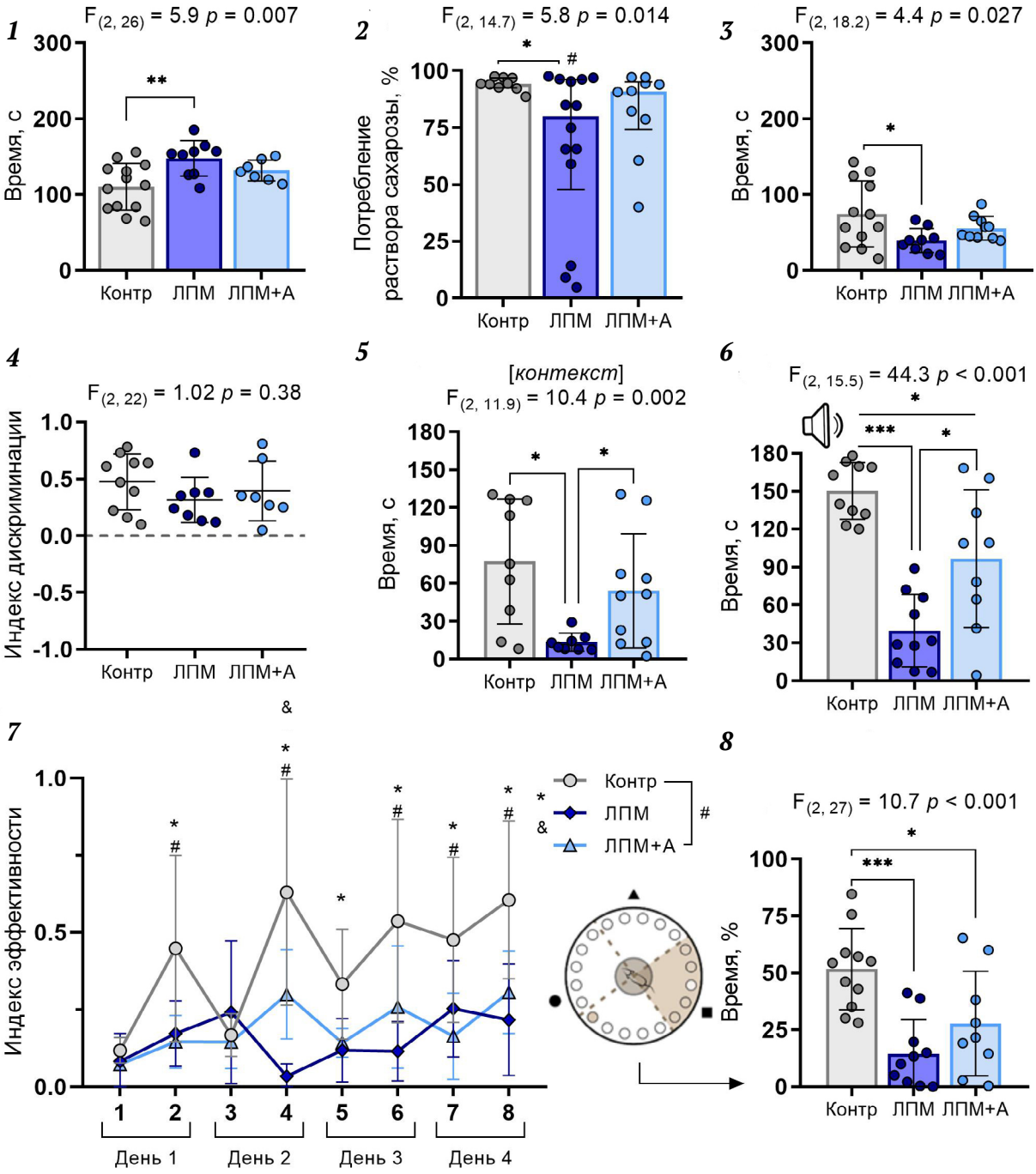
Для крыс ЛПМ характерна двигательная гиперактивность в открытом поле (см. рисунок, *1*), ангедония в тесте предпочтения раствора сахарозы (см. рисунок, *2*) и снижение исследовательской активности при взаимодействии с новыми объектами (см. рисунок, *3*). Применение анакинры привело к коррекции всех перечисленных нарушений (см. рисунок, *1–3*).

При анализе когнитивных функций в тесте распознания нового объекта во всех группах значимого нарушения распознания не наблюдалось (см. рисунок, *4*), что свидетельствует о сохранности эпизодической памяти. Характерное для крыс ЛПМ нарушение памяти, ассоциированной со страхом, после применения анакинры было полностью скорректировано в контекстной пробе (см. рисунок, *5*) и частично в пробе с подачей условного звукового сигнала (см. рисунок, *6*) при оценке условно-рефлекторного замирания.

* Авторы выражают благодарность Александру Митрофановичу Ищенко за предоставление препарата анакинра.

© А. В. Дёмина, М. О. Грязнова, А. П. Шварц, А. В. Зайцев, 2024

Невзирая на полное восстановление у крыс ЛПМ+А пространственного компонента памяти, ассоциированной со страхом, в лабиринте Барнса между крысами ЛПМ+А и ЛПМ не обнаружено значимых отличий по эффективности выполнения задачи (см. рисунок, *7*), которая была значимо хуже, чем в контрольной группе ($F_{14,193}$ = = 3,54, $p < 0{,}001$). В течение тестовой попытки крысы ЛПМ и ЛПМ+А практически не обследовали целевой сектор по сравнению с контрольными крысами (см. рисунок, *8*). В совокупности эти данные указывают на нарушения обучения и памяти при выполнении задачи пространственной точности, которые применение анакинры скорректировать не помогло.



Характеристики поведения крыс в хроническую фазу литий-пилокарпиновой модели: *1* — общее время локомоции в открытом поле; *2* — потребление раствора сахарозы за 22 часа, # $p > 0{,}05$ в одновыборочном тесте Вилкоксона; *3* — общее время обследования игрушек за 5 минут в тесте распознания нового объекта; *4*— индекс дискриминации нового объекта, все выборки значимо отличаются от 0 при сравнении одновыборочным t-тестом; *5* — общее время замирания в контекстной пробе и *6* — при предъявлении условного сигнала (звук); *7* — эффективность поиска убежища, *,#,& $p < 0{,}05$ при межгрупповых сравнениях; *8* — время, проведенное в целевом секторе (обозначен заливкой на вставке). * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$ в post hoc Тьюки или Гемса-Хоуэлла

Восстановление памяти, ассоциированной со страхом, нормализация двигательной и исследовательской активности, а также отсутствие депрессивноподобных симптомов у крыс ЛПМ после применения анакинры может свидетельствовать о восстановлении функций миндалевидного тела, являющегося одной из эпилептогенных мезиально-височных структур [2, 3, 4]. При этом, исходя из результатов в лабиринте Барнса, функции гиппокампа не были полностью восстановлены, невзирая на выявленный в предыдущих исследованиях нейропротективный [1] и противовоспалительный [5] эффект анакинры. Таким образом, превентивная противовоспалительная фармакотерапия с помощью IL-1Ra (анакинра) не только снижает тяжесть спонтанных судорог [1], но и корректирует поведенческие отклонения, характерные для крыс с височной эпилепсией и, по-видимому, ассоциированные с нарушением функций миндалевидного тела.

Литература

1. Dyomina, A. V. et al. Anakinra Reduces Epileptogenesis, Provides Neuroprotection and Attenuates Behavioral Impairments in Rats in the Lithium–Pilocarpine Model of Epilepsy // Pharmaceuticals. 2020. Vol. 13(11). P. 340.

2. Gruenbaum S. E. et al. Inhibition of glutamine synthetase in the central nucleus of the amygdala induces anhedonic behavior and recurrent seizures in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy // Epilepsy & Behavior. 2015. Vol. 51. P. 96–103.

3. Olucha-Bordonau F. E., Fortes-Marco L., Otero-García M. et al. Amygdala: Structure and Function // The Rat Nervous System, 2015. P. 441–490.

4. Vasilev D. S. et al. Neuroinflammatory Processes Affect Structural Changes in the Amygdala of Rats in a Lithium-Pilocarpine Model of Epilepsy // Neurosci. Behav. Physiol. 2020. Vol. 50(5). P. 625–632.

5. Zakharova M. V. et al. Anakinra Promotes M2 Microglia Activation during the Latent Phase of the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy// J. Evol. Biochem. Phys. 2024. Vol. 60. P. 672–689.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-318

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN THE RAT HIPPOCAMPUS IN THE LITHIUM-PILOCARPINE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

Г. П. Диеспиров, Т. Ю. Постникова, А. В. Зайцев

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

G. P. Diespirov, T. Y. Postnikova, A. V. Zaitsev

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg

✉ diespirov.gp@yandex.ru

Аннотация

Эпилепсия вызывает изменения в нейронных сетях. Целью работы было изучение свойств нейронов CA1 гиппокампа и их входов в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии. Мы обнаружили усиление прямого пути от энторинальной коры к CA1, а входы из CA3 уменьшаются. При этом плотность дендритных шипиков в str. lacunosum moleculare у крыс с эпилепсией в 2,5 раза выше. Кроме того, суммация ответов при стимуляции прямого пути из энторинальной коры была усилена примерно в 2 раза.

Abstract

Epilepsy causes changes in neuronal networks. The aim of this work was to study the properties of hippocampal CA1 neurons and their inputs in a lithium-pilocarpine model of epilepsy. We found an enhancement of the direct pathway from entorhinal cortex to CA1, while inputs from CA3 are reduced. Moreover, the density of dendritic spicules in str. lacunosum moleculare, is 2,5-fold higher in rats with epilepsy. In addition, the summation of responses upon stimulation of the direct pathway from the entorhinal cortex was enhanced approximately 2-fold.

Эпилепсия является распространенным неврологическим расстройством, в результате которого у пациентов развивается множество нарушений, в том числе снижение способности к обучению и памяти [1]. Наиболее часто при височной эпилепсии (ВЭ) страдает гиппокамп, который играет важную роль в процессе консолидации памяти [2]. Эти нарушения могут возникать из-за дисбаланса взаимодействия регионов гиппокампа между собой, а также гиппокампа с энторинальной корой. Однако полная картина морфофункциональных изменений гиппокампа при ВЭ до сих пор остается неясной.

Целью данного исследования было изучение морфофункциональных особенностей пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа и их синаптических входов в литий-пилокарпиновой модели ВЭ у крыс.

У самцов крыс Wistar в возрасте 21 день внутрибрюшинным введением пилокарпина (30 мг/кг) индуцировали эпилептический статус (ЭС), перед этим за сутки вводили LiCl (127 мг/кг), за полчаса — метилскополомин (1 мг/кг) [3]. Электрофизиологические исследования проводили на переживающих горизонтальных срезах мозга крыс методом патч-кламп в режиме «целая клетка» через 30–35 дней после ЭС. Синаптические ответы от пирамидных нейронов CA1 получали при стимуляции биполярными электродами, расположенными в коллатералях Шаффера (путь от области CA3 гиппокампа) и височно-гиппокампальном пути (путь из 3 слоя энторинальной коры — *temporoammonic pathway*). Проводилась попеременная стимуляция двух путей парными стимулами и пачками из 5 стимулов. Для записи ответов использовались блокатор NMDA-рецепторов AP-5 (50 mM, Sigma-Aldrich) и блокатор ГАМКа-рецепторов бикукулин (20 mM, Sigma-Aldrich). Также проводилась оценка плотности дендритных шипиков в лучистом и молекулярном лакунозном слоях поля CA1. Эти области соответствуют местам образования синаптических контактов коллатералей Шаффера и височно-гиппокампального пути с нейронами CA1 [4]. Для этого пирамидные нейроны через микропипетку заполнялись биоцитином. После срезы фиксировались в 4%-ном растворе параформальдегида и инкубировались в конъюгате стрептавидин + Alexa Fluor 488 (1:500 в PBS; Invitrogen). На конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) получали изображения пирамидных нейронов и затем проводили подсчет плотности дендритных шипиков на микрометр.

Ранее в нашем исследовании на полевых постсинаптических потенциалах мы показали снижение синаптической нейротрансмиссии между областями CA3 и CA1 гиппокампа [5]. В данной работе при парной стимуляции

© Г. П. Диеспиров, Т. Ю. Постникова, А. В. Зайцев, 2024

было выявлено снижение вероятности выброса медиатора из коллатералей Шаффера, а также снижение амплитуды ответов на пачки из 5 стимулов у крыс с хронической эпилепсией. Однако при стимуляции височно-гиппокампального пути мы обнаружили увеличение амплитуд ответов примерно в 2 раза, что свидетельствует о том, что у крыс с височной эпилепсией этот путь может поддерживать большую возбуждающую активность. Также нами было показано, что плотность дендритных шипиков нейронов CA1 в области молекулярного лакунозного слоя в 2,5 раза выше у крыс с ВЭ, тогда как в лучистом слое различий не выявлено.

Полученные данные свидетельствуют о комплексе морфофункциональных изменений в области CA1 гиппокампа в литий-пилокарпиновой модели ВЭ. Повышенная активация височно-гиппокампального пути может способствовать формированию спонтанных судорог. Это согласуется с выявленным повышением плотности дендритных шипиков, что, вероятно, является следствием повышенной синаптической передачи по височно-гиппокампальному пути. Эти данные открывают перспективы по дальнейшему исследованию морфофункциональных изменений в мозге при височной эпилепсии.

Литература

1. Bonansco C., Fuenzalida M. Plasticity of hippocampal excitatory-inhibitory balance: Missing the synaptic control in the epileptic brain // Neural Plast. 2016. Vol. 2016.

2. Téllez-Zenteno J. F., Hernández-Ronquillo L. A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy // Epilepsy Res. Treat. 2012. Vol. 2012. P. 1–5.

3. Postnikova T. Y. et al. Impairments of long-term synaptic plasticity in the hippocampus of young rats during the latent phase of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22, № 24.

4. Knierim J. J. The hippocampus // Curr. Biol. 2015. Vol. 25, № 23. P. R1116–R1121.

5. Diespirov G. P. et al. Alterations in the Properties of the Rat Hippocampus Glutamatergic System in the Lithium-Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy // Biochem. 2023. Vol. 88, № 3. P. 353–363.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-319

ПОИСК ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВ АНТАГОНИСТОВ NMDA- И AMPA-РЕЦЕПТОРОВ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА И ПИРАЗИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА *

SEARCH FOR DRUG PROTOTYPES FOR NMDA- AND AMPA-RECEPTOR ANTAGONISTS AMONG QUINOXALINE AND PYRAZINOBENZIMIDAZOLE DERIVATIVES

М. Ю. Дронь[1], О. И. Барыгин[1], Д. В. Мальцев[2], Л. Н. Диваева[3], А. А. Зубенко[4], А. А. Спасов[2]

[1]*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург*
[2]*Волгоградский государственный медицинский университет*
[3]*Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону*
[4]*Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт, Новочеркасск*

M. Yu. Dron[1], O. I. Barygin[1], D. V. Maltsev[2], L. N. Divaeva[3], A. A. Zubenko[4], A. A. Spasov[2]

[1]*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg*
[2]*Volgograd State Medical University*
[3]*Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Rostov-on-Don*
[4]*North-Caucasian Zonal Scientific Veterinary Institute, Novocherkassk*

✉ neuro.mike@yahoo.com

Аннотация

Проект посвящен скринингу блокаторов ионотропных глутаматных рецепторов в ряду производных пиразинобензимидазолов и хиноксалинов. В качестве объекта исследования были использованы пирамидные нейроны гиппокампа крыс линии Wistar. При помощи метода локальной фиксации потенциала было выявлено наиболее активное соединение — это представитель класса хиноксалина с шифром ЗДМ-15.

Abstarct

The project is dedicated to screening of ionotropic glutamate receptors inhibitors among pyrazinobenzimidazole and quinoxaline derivatives. The pyramidal neurons of the hippocampus of Wistar rat brain were used for the study. With the patch clamp technique, we found the most active compound — this is a representative of the quinoxaline class with the code name ZDM-15.

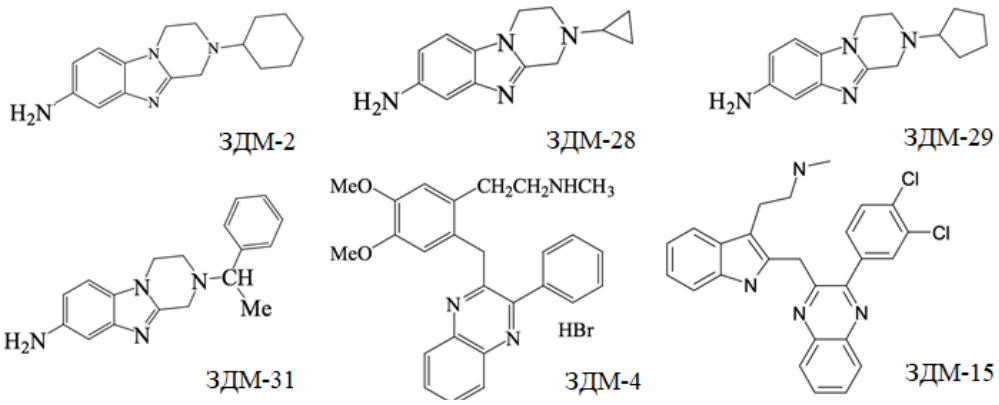
Глутаматергическая система является главным компонентом нервной системы человека, который ответственен за реализацию процессов возбуждения, благодаря этим процессам осуществляется подавляющее число физиологических функций тела [1]. Логично, что такой широкий функциональный диапазон задействован и при различных патофизиологических состояниях мозга, при этом не всегда отклонения в работе глутаматергической системы являются превалирующими, вовлекаясь при этом, казалось бы, самым незначимым, косвенным образом [2]. Так, при эпилепсии, глутаматергическая система вносит значимый вклад в манифестацию и течение болезни на молекулярном уровне [3], в то время как при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и боковом амиотрофическом склерозе патологические изменения в работе глутаматергической системы являются однозначными, но при этом охарактеризованными в недостаточной мере, что позволяет лишь говорить о патологическом модулирующем вкладе при запуске и последующем развитии нейродегенеративных процессов [4]. Поиск соединений-ингибиторов ионотропных глутаматных рецепторов мог бы помочь в решении вопросов, связанных с разбалансировкой работы глутаматергической системы.

В сотрудничестве с НИИ ФОХ ЮФУ нами была проведена оценка ингибирующей активности производных хиноксалина и пиразинобензимидазола. Хиноксалиндионы являются известными конкурентными антагонистами AMPA-рецепторов (NBQX, DNQX), в то время как другие производные хиноксалина ингибируют NMDA-рецепторы, взаимодействуя с сайтом связывания глицина [5, 6]. Производные бензимидазола также обладают ингибирующей активностью в отношении NMDA-рецепторов [7]. Таким образом, выбор соединений именно этих химических классов является оправданным с позиций существующих научных литературных данных.

* Исследование проведено с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН в рамках государственного задания № 075-00264-24-00.

© М. Ю. Дронь, О. И. Барыгин, Д. В. Мальцев, Л. Н. Диваева, А. А. Зубенко, А. А. Спасов, 2024

Острый эксперимент включал в себя приготовление пипеточного, срезного и клеточного растворов, а также приготовление переживающих срезов головного мозга крыс-самцов линии Wistar 14 дней жизни. Срезы гиппокампа подвергались вибродиссоциации [8], запись интегральных токов осуществлялась методом пэтч-кламп в конфигурации целая клетка, режим фиксации потенциала. Осуществлялась аппликация агонистов (100 μM NMDA и 10 μM глицина для NMDA-рецепторов; 100 μM каината для KH-AMPA-рецепторов) и предполагаемых антагонистов NMDA- и KH-AMPA-рецепторов пирамидальных нейронов CA1 зоны гиппокампа. Для скрининга использовались производные хиноксалина ЗДМ-4, ЗДМ-15 [9] и пиразинобензимидазола ЗДМ-2, ЗДМ-28, ЗДМ-29, ЗДМ-31. Формулы данных соединений, синтезированных в лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ЮФУ, представлены на рисунке. Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Origin 6.0. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение», рассчитанное на основании как минимум 4 экспериментов. В работе использовался протокол подачи агониста в контроле и коаппликации с соединениями в эксперименте.



Химические формулы исследованных веществ — производных хиноксалина (ЗДМ-4, ЗДМ-15) и пиразинобензимидазола (ЗДМ-2, ЗДМ-28, ЗДМ-29, ЗДМ-31)

Таблица описывает полученные нами результаты скрининга в двух концентрациях: 10 и 100 μM. Две вышеуказанные скрининговые точки достаточно хорошо дают представление о том, как сильно развивается эффект исследуемых веществ в отношении ионотропных глутаматных рецепторов, преследуемых задачей скрининга. Пиразинобензимидазольный кор с заместителями циклогексила, циклопропила, циклопентила и фенилэтила не оказал выраженного ингибирующего эффекта на ионотропные глутаматные рецепторы. Производное хиноксалина ЗДМ-4 также не проявило выраженной активности, однако ингибирующая активность второго производного ЗДМ-15 значительно возросла.

Результат скрининга. Процент ингибирования интегральных токов NMDA- и KH-AMPA-рецепторов производными хиноксалина и пиразинбензимидазола в концентрациях 10 и 100 μM

Шифр	Ингибирование NMDAR, %		Ингибирование KH-AMPAR, %	
	10 μM	100 μM	10 μM	100 μM
ЗДМ-2	0	45 ± 6,4	0	17 ± 3,7
ЗДМ-4	15 ± 3,4	50 ± 5,6	0	40 ± 3,3
ЗДМ-15	82 ± 8,5	100	35 ± 5,0	83 ± 11
ЗДМ-28	10 ± 3,7	85 ± 8,9	0	11 ± 3,9
ЗДМ-29	0	61,5 ± 5,1	0	5 ± 2,3
ЗДМ-31	8,5 ± 1,7	51 ± 3,9	0	19,5 ± 3,6

Таким образом, нами было найдено соединение ЗДМ-15, активно ингибирующее NMDA-рецепторы. Дополнительно была отмечена невысокая ингибирующая активность данного соединения при действии на KH-AMPA-рецепторы. Обнаружение новых антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов способствует разработке препаратов для терапии эпилепсии, депрессии и ряда нейродегенеративных заболеваний.

Литература

1. Niciu M. J., Kelmendi B., Sanacora G. Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system // Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2012. Vol. 100. № 4. P. 656–664.

2. Sanacora G. et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders // Nature reviews Drug discovery. 2008. Vol. 7. № 5. P. 426–437.

3. Rogawski M.A. Revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target: revisiting AMPA receptors as an antiepileptic drug target // Epilepsy currents. 2011. Vol. 11. № 2. P. 56–63.

4. Chazot P.L. The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies // Current medicinal chemistry. 2004. Vol. 11. № 3. P. 389–396.

5. Randle J.C. et al. Quinoxaline derivatives: structure-activity relationships and physiological implications of inhibition of N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated currents and synaptic potentials // Molecular pharmacology. 1992. Vol. 41. № 2. P. 337–345.

6. Pellegrini-Giampietro D.E. et al. Quinoxalines interact with the glycine recognition site of NMDA receptors: studies in guinea-pig myenteric plexus and in rat cortical membranes // British journal of pharmacology. 1989. Vol. 98. № 4. P. 1281.

7. Sun L. et al. Characterization of Two Novel N-Methyl-D-aspartate Antagonists: EAA-090 (2-[8, 9-Dioxo-2, 6-diazabicyclo [5.2. 0] non-1 (7)-en2-yl] ethylphosphonic Acid) and EAB-318 (R-α-Amino-5-chloro-1-(phosphonomethyl)-1H-benzimidazole-2-propanoic Acid Hydrochloride) // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2004. Vol. 310. № 2. P. 563–570.

8. Vorobjev V.S. Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue // Journal of neuroscience methods. 1991. Vol. 38. № 2–3. P. 145–150.

9. Zubenko A.A. et al. New route to bioactive 2-(hetero) arylethylamines via nucleophilic ring opening in fused 7-acyl-2, 3-dihydroazepines // Mendeleev Communications. 2020. Vol. 30. № 1. P. 28–30.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-320

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛАМИДА СТЕАРИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ТЕРАПИИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF STEARIDONIC ACID ETHANOLAMIDE IN THE TREATMENT OF MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY

А. А. Егораева, И. В. Манжуло, А. И. Пономаренко, Д. Н. Ивашкевич

Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

A. A. Egoraeva, I. V. Manzhulo, A. I. Ponomarenko, D. N. Ivashkevich

Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok

✉ egoraeva.nastya@gmail.com

Аннотация

Единичные/повторяющиеся легкие черепно-мозговые травмы (лЧМТ) могут способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний из-за хронического нейровоспаления. Поэтому необходим поиск новых терапевтических стратегий для лечения лЧМТ. В нашем исследовании *in vitro* и *in vivo* охарактеризовано новое соединение липидной природы, проявляющее противовоспалительную активность.

Abstract

Single/repetitive mTBI may contribute to the development of neurodegenerative diseases due to chronic neuroinflammation. Therefore, the search for new therapeutic strategies for the treatment of mTBI is necessary. Our *in vitro* and *in vivo* study characterized a new lipid compound exhibiting anti-inflammatory and antioxidant activity.

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из ведущих причин смертности и инвалидности во всем мире. Ежегодно регистрируется более 69 млн новых случаев, из них — 80–90 % приходится на лЧМТ. Несмотря на низкую степень тяжести, при лЧМТ формируется нейровоспалительный процесс, который ведет к окислительному стрессу, повреждению аксонов, и, как следствие, могут развиваться острые, подострые и хронические неврологические нарушения. В первую очередь клетками, ответственными за его формирование, является микроглия. Она реагирует в течение нескольких минут и может оставаться в активированном состоянии в течение многих лет после лЧМТ [1]. В связи с этим необходим поиск и разработка лекарственных средств, обладающих противовоспалительным действием.

Многообещающими соединениями являются вещества с липидной природой — этаноламиды полиненасыщенных жирных кислот (N-ацилэтаноламины). Они в несколько десятков раз по эффективности превосходят омега-3 ПНЖК, проявляя противовоспалительную активность, усиливая выработку нейротрофинов и антиоксидантных ферментов [2]. В нашем исследовании впервые был использован этаноламид стеаридоновой кислоты (ЭСК) для оценки его терапевтического потенциала.

Этаноламид стеаридоновой кислоты был получен из пищеварительной железы кальмара *Berryteuthis magister* по методу Латышева [3]. Исследования *in vitro* проводили на линии мышиных микроглиальных клеток — SIM-A9, используя ЭСК в концентрациях 0,1, 1 и 10 мкМ. В качестве индуктора воспалительной реакции использовали липополисахарид (ЛПС) в концентрации 1 мкг/мл. Для выявления цитотоксического действия ЭСК проводили MTS-тест, также оценивали его способность подавлять выработку оксида азота (NO) и активных форм кислорода (АФК). Эксперимент *in vivo* проводили 2,.5 месяца на самцах мышей линии C57BL/6, которые поделили на 5 групп: «Контроль», «Контроль + ЭСК», «лЧМТ», «лЧМТ + ЭСК» и «лЧМТ + ЦЕР» (лЧМТ + церебролизин). Этаноламид стеаридоновой кислоты и препарат-сравнение (церебролизин) вводили подкожно в дозах 10 мг/кг и 43 мг/кг, соответственно. Изучаемые вещества вводили за 2 дня до травмы, в день травмы и далее в течение 7 суток. Для моделирования закрытой лЧМТ применялась модель свободного падения груза на череп мыши. Морфологическую структуру коры головного мозга оценивали с помощью окраски гематоксилин-эозином, микроглиальную активность — иммуногистохимическим маркером к iba-1. Дополнительно, был проведен анализ коры головного мозга методом вестерн-блот на провоспалительные цитокины (ИЛ-1β, ИЛ-6, ФНОα).

© А. А. Егораева, И. В. Манжуло, А. И. Пономаренко, Д. Н. Ивашкевич, 2024

В ходе *in vitro* исследований выявлено, что ЭСК не оказывал цитотоксического влияния на культуру клеток. Помимо этого, ЭСК достоверно снижал ЛПС-индуцированную продукцию АФК и NO.

In vivo при изучении аутопсийного материала во всех группах не было выявлено внутримозговых и субдуральных кровоизлияний. Также при морфологическом анализе коры головного мозга не было обнаружено признаков патологии. Тем не менее в ходе иммуногистохимической оценки нейровоспаления были найдены изменения в активации микроглии между контрольными животными и «лЧМТ», «лЧМТ + ЭСК», «лЧМТ + церебролизин». Было установлено, что микроглиальная активность в группе «лЧМТ» достоверно увеличивалась относительно контроля ($p < 0{,}001$). Применение ЭСК понижало ее активность до уровня группы «Контроль». В то же время введение церебролизина не оказывало влияние на данный показатель, оставаясь на уровне группы «лЧМТ». Анализ методом вестерн-блот продемонстрировал повышение провоспалительных маркеров в корковой зоне при лЧМТ и их понижение после введения ЭСК. При этом введение церебролизина сопровождалось менее выраженным снижением уровня выработки ИЛ-1β и ИЛ-6, но не ФНОα.

Таким образом, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* ЭСК проявлял противовоспалительную активность, ингибируя выработку провоспалительных цитокинов и подавляя активацию микроглии. В связи с этим исследуемое соединение является перспективным веществом для коррекции последствий лЧМТ.

Литература

1. Gardner R. C., Yaffe K. Epidemiology of mild traumatic brain injury and neurodegenerative disease // Molecular and Cellular Neuroscience. 2015. Vol. 66 (Pt B). P. 75–80.

2. Tyrtyshnaia A., Konovalova S., Ponomarenko A., Egoraeva A., Manzhulo I. Fatty Acid-Derived N-acylethanolamines Dietary Supplementation Attenuates Neuroinflammation and Cognitive Impairment in LPS Murine Model // Nutrients. 2022. Vol. 14 (18). P. 3879.

3. 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: 10.25205/978-5-4437-1691-6-321

АПОПТОЗ-ИНДУЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛЕТКАМ МЕЛАНОМЫ МЫШИ *

APOPTOSIS-INDUCING EFFECT OF *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS* EXTRACT IN RELATION TO MOUSE MELANOMA CELLS

А. Н. Егоров, Р. А. Готовцев, И. П. Троев

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

A. N. Egorov, R. A. Gotovtsev, I. P. Troev

Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk

✉ 291219942014@mail.ru

Аннотация

Экстракт *Phlojodicarpus sibiricus* продемонстрировал сильное цитотоксическое и апоптоз-индуцирующее действие на клеточную линию мышиной меланомы B16. Наибольший эффект наблюдался при высоких концентрациях экстракта, что подтверждает важность концентрации при оценке его действия. В данной статье рассматривается влияние экстракта, полученного из надземных частей, на раковые клетки меланомы мыши B16.

Abstract

Phlojodicarpus sibiricus extract demonstrated strong cytotoxic and apoptosis-inducing effects on B16 murine melanoma cell line. The greatest effect was observed at high concentrations of the extract, confirming the importance of concentration in assessing its effect. This article reviews the effect of the extract obtained from the aerial parts on B16 murine melanoma cancer cells.

Лекарственные свойства растений обусловлены широким спектром вторичных метаболитов, таких как терпеноиды, фенольные кислоты, лигнаны, дубильные вещества, флавоноиды, хиноны, кумарины и алкалоиды, которые оказывают важное антиоксидантное, антимутагенное, противовоспалительное, иммуномодулирующее и противоопухолевое действие [1]. По данным ВОЗ, около 80 % населения мира использует растения в качестве основного источника лекарств, и, более того, около 60 % населения мира, особенно в развивающихся странах, используют традиционную медицину в качестве единственного метода лечения [2]. Ранее нами была изучена цитотоксичность экстракта вздутоплодника сибирского на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 [3]. Вздутоплодник сибирский является известным лекарственным растением народной медицины в Якутии и известен своим богатством биологически активных соединений, таких как флавоноиды, каротиноиды и полифенолы, которые обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами [4]. Возможные механизмы противоопухолевого действия фенольных веществ вздутоплодника связывают с их способностью модулировать различные сигнальные каскады, вовлеченные в канцерогенез меланомы. Флавоноиды, благодаря выраженным антиоксидантным свойствам, ингибируют повреждающее действие активных форм кислорода и азота, предотвращая окислительный стресс, мутации ДНК и злокачественную трансформацию меланоцитов [5]. Кумарины, в свою очередь, ингибируют факторы ангиогенеза (VEGF, MMP) и подавляют неоваскуляризацию опухоли, а также снижают экспрессию молекул клеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1), что препятствует инвазии и метастазированию меланомы [6].

Целью данного исследования было оценить апоптоз-индуцирующий эффект экстракта вздутоплодника сибирского (лат. *Phlojodicarpus sibiricus*) на злокачественные клетки мышиной меланомы B16 в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использовали экстракт, полученный из вздутоплодника сибирского (лат. *Phlojodicarpus sibiricus* (*Fisch. ex Spreng.*) *Koso-Pol.*). Сбор надземной части (листья, стебли) был собран во время цветения в июле на территории питомника Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны СО РАН.

* Работа выполнена в рамках федерального проекта «Развитие человеческого капитала в интересах регионов, отраслей и сектора исследований и разработок» национального проекта «Наука и университеты», шифр тематики FSRG-2022-0009 «Разработка и испытание новых биомедицинских клеточных продуктов, композиционных медицинских изделий».

© А. Н. Егоров, Р. А. Готовцев, И. П. Троев, 2024

В данном исследовании использовалась клеточная линия меланомы мыши B16 (предоставленная Научно-исследовательским институтом фундаментальной и клинической иммунологии в Новосибирске). Культивирование клеток проходило в 12-луночных планшетах с начальной плотностью 2 × 10^5 клеток в лунке. Когда клетки достигли 60 % монослоя, среду заменяли на свежую и добавляли 100 мкл растительного экстракта в разведениях 1:100, 1:50, 1:20 и 1:10, инкубируя в течение 24 часов. После инкубации клетки окрашивали красителем Annexin V-FITC/PI согласно протоколу производителя, а анализ проводили с помощью проточной цитометрии на аппарате Beckman Coulter Navios, что обеспечивало быстрый и чувствительный метод для выявления апоптоза.

Результаты

Результаты эксперимента представлены в таблице и показывают дифференциацию живых, апоптических и мертвых клеток. В контрольной группе высокая жизнеспособность клеток составила 98,1 %, при этом 1,1 % клеток находились в состоянии апоптоза и 0,5 % были мертвы. Это указывает на нормальную жизнеспособность клеточной линии без обработки. При разведении экстракта 1:100 процент живых клеток снизился до 92,1 %, количество апоптических клеток увеличилось до 1,9 %, а мертвых — до 5,4%, что указывает на незначительный эффект. При разведении 1:50 живых клеток стало лишь 28,1 %, мертвых — 69,9 %, а апоптических — 1,5 %, что свидетельствует о более выраженном токсическом эффекте. При разведении 1:20 живых клеток осталось 2,6 %, мертвых — 95,7 %, и апоптических — 1,2 %, что указывает на критический уровень токсичности.

Влияние различных концентраций экстракта вздутоплодника сибирского на раковые клетки меланомы мыши B16

	Живые клетки	Апоптоз	Мертвые клетки
Контрольная группа	98,1 %	1,1 %	0,5 %
Разведение 1:100	92,1 %	1,9 %	5,4 %
Разведение 1:50	28,1 %	1,5 %	69,9 %
Разведение 1:20	2,6 %	1,2 %	95,7 %

Заключение

Данные показывают, что полученный нами экстракт из вздутоплодника сибирского оказывает сильное ингибирующее действие на клеточную линию меланомы мыши B16 с увеличением концентрации экстракта. Особенно выраженный эффект наблюдается при разбавлении 1:50 и ниже. Можем предположить о потенциальных лечебных свойствах экстракта, который может быть полезным для дальнейших разработок в области онкологии, но требует осторожного подхода к дозировкам.

Литература

1. Abdul-Hafeez E. Y., Karamova N. S., Ilinskaya O. N. Antioxidant activity and total phenolic compounds content of certain medicinal plants // Int. J. Biosci. 2014. Vol. 5. № 9. P. 213–222. DOI: 10.12692/ijb/5.9.213-222.

2. El-Seedi H. R., Burman R., Mansour A., Turki Z., Boulos L., Gullbo J., Göransson U. The traditional medical uses and cytotoxic activities of sixty-one Egyptian plants: discovery of an active cardiac glycoside from Urginea maritima // J. Ethnopharmacol. 2013. Vol. 145. № 3. P. 746–757. DOI: 10.1016/j.jep.2012.12.007.

3. Golderova S. A., Egorov N. A., Voronov V. I., Gotovtsev A. R. Effect of Phlojodicarpus sibiricus on the proliferative activity of the HepG2 cell line // Journal of Complementary Medicine Research. Vol. 14. № 4. 2023. P. 62–65. DOI: 10.5455/jcmr.2023.14.04.13.

4. Воронов И. В., Филиппова Г. В., Дарханова В. Г. и др. Антирадикальная и антиоксидантная активность экстрактов трех видов лекарственных растений и ряски малой // Природные ресурсы Арктики и Субарктики. 2019. Т. 24. № 4. С. 127–133.

5. Olennikov D. N., Chirikova N. K. New Compounds from Flowers of Phlojodicarpus sibiricus // Chemistry of Natural Compounds. 2020. Vol. 56. P. 618–621. DOI: 10.1007/s10600-020-03109-9.

6. Zheng C. J., Li H. Q., Ren S. C., Xu C. L., Rahman K., Qin L. P., Sun Y. H. Phytochemical and Pharmacological Profile of Vitex negundo // Phytotherapy Research. 2015. Vol. 29. P. 633–647. DOI: 10.1002/ptr.5303.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-322

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИМЕНИМОСТИ СКАНИРУЮЩЕЙ ТЕРМОГРАФИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РЕАКЦИЙ СТРЕССА ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF SCANNING THERMOGRAPHY FOR DETECTING STRESS REACTIONS IN INDIVIDUALS WITH POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

В. И. Закуражная[1], А. М. Цурина[1,2]

[1]*Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н. А. Алексеева, Москва*
[2]*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва*

V. I. Zakurazhnaya[1], A. M. Tsurina[1,2]

[1]*Alekseev Mental-Health Clinic № 1, Moscow*
[2]*Pirogov Russian National Research Medical University, Faculty of Biomedicine, Moscow*

✉ i@savva9806.ru

Аннотация

В ходе исследования изучалась возможность использования сканирующей термографии для определения стрессовых реакций у пациентов с посттравматическим стрессовом расстройстве (ПТСР). Пациенты с ПТСР и здоровые добровольцы просматривали стимулирующие видеоматериалы, в это время проводилась оценка термографических показателей на разных участках кожи лица. В результате были обнаружены статистически значимые различия в термографических показателях между группами.

Abstract

The study investigated the potential use of scanning thermography to detect stress responses in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD). Patients with PTSD and healthy participants watched stimulating videos while thermographic measurements were taken from various areas of their facial skin. The results revealed statistically significant differences in the thermographic parameters between the two groups.

Введение

Термография — это неинвазивный метод для оценки тепловых реакций. Этот метод широко используется в психофизиологических исследованиях различных эмоциональных реакций [1]. Несмотря на то, что ранее уже были опубликованы данные о применении термографии в изучении различного рода стресса [2–5], на данный момент количество исследований о выявлении реакций стресса у пациентов с посттравматическим стрессовом расстройстве (ПТСР) ограничено.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 55 человек: 20 здоровых участников и 35 ветеранов боевых действий с ПТСР. В качестве стимула использовалось видео с нейтральными и стимуляционными сценами. Затем вручную были выделены четыре области: лобная и периоральная области, нос, рот и произведен статистический анализ.

Результаты

При сравнении средних значений было обнаружено, что у группы людей с ПТСР температуры всех областей лица были выше, чем у контрольной группы: лоб ($p = 0{,}003$); глаза ($p = 0{,}004$); нос ($p = 0{,}002$); рот ($p = 0{,}009$). Стандартное отклонение и минимальное значение температуры также показали статистически значимые различия по всем областям. Максимальное значение температуры было выше только в области носа у группы людей с ПТСР ($p = 0{,}043$). Все средние значения температуры имели статистически значимую и очень сильную положительную корреляцию (рис. 1).

Мы провели однофакторный логистический регрессионный анализ, чтобы оценить влияние средней температуры лица на наличие ПТСР у пациентов (рис. 2). Также мы определили пороговые значения и сделали ROC-анализ (см. таблицу).

© В. И. Закуражная, А. М. Цурина, 2024

Пороговое значение среднего значения температур во всех областях лица и результаты ROC-анализа

Параметр	Лоб	Глаза	Нос	Рот
Значение, °C	29,54	29,67	29,69	29,79
Чувствительность, %	74,3	72,7	65,71	68,57
Специфичность, %	90,0	90,0	90,0	90,0
AUC	0,743	0,736	0,747	0,714

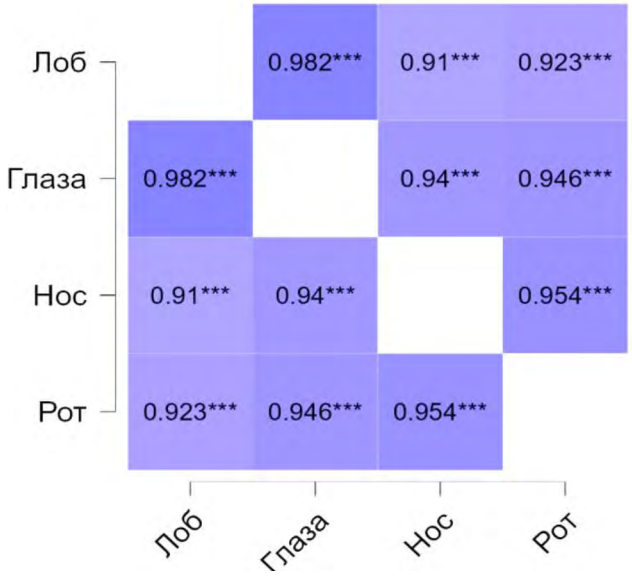


Рис. 1. Корреляционный анализ средних значений температур. *** — $p < 0{,}001$

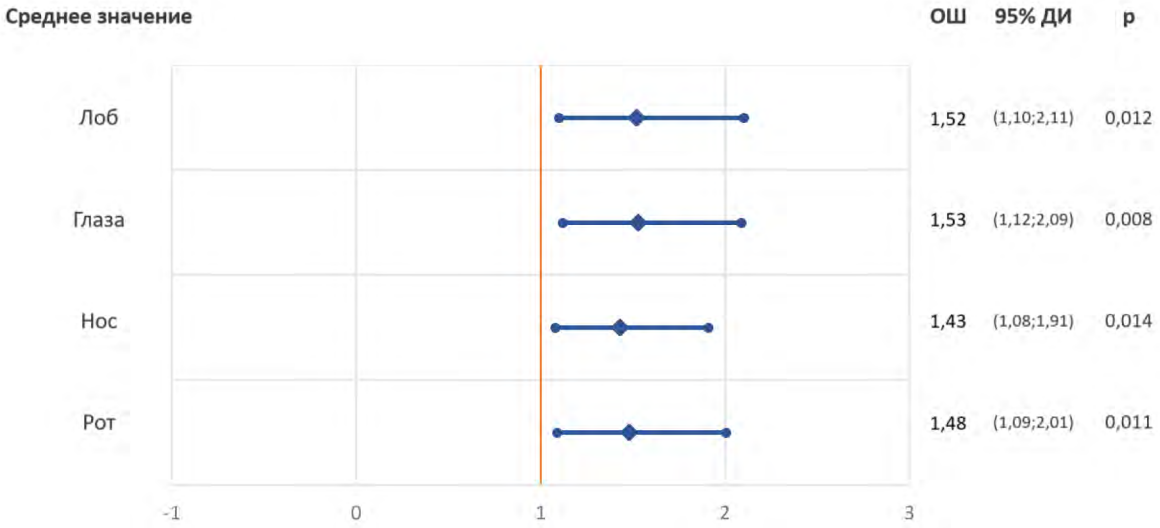


Рис. 2. Достоверность различия и степень разброса средних сигналов термографии в выборках здорового контроля и пациентов с ПТСР на разных участках лица

Температура в области лба выше 29,54 °C увеличивает вероятность наличия у пациента ПТСР на 52 % (p = 0,0012). Площадь под кривой, полученная в результате ROC-анализа, составила 0,743. Температура в области глаз выше 29,67 °C также повышает вероятность ПТСР у пациента на 53 % (p = 0,008). Площадь под кривой, полученная в ходе ROC-анализа, составила 0,736. Повышение температуры в других областях лица, таких как

нос и рот, также влияет на наличие ПТСР, но в меньшей степени. Вероятность ПТСР увеличивается на 43 % (p = 0,014), если температура в области носа выше, и на 48 % (p = 0,011), если температура в области рта выше.

Обсуждение

Когда человек испытывает стресс, температура лица снижается из-за симпатической вазоконстрикции кровеносных сосудов [6]. Психический стресс влияет на высвобождение кортиколиберина из гипоталамуса, что приводит к снижению синтеза оксида азота и повышению концентрации провоспалительных цитокинов. Ожидалось, что температура лица снизится [7]. Тем не менее в нашем исследовании у пациентов с ПТСР были более высокие значения температуры по всем областям лица. Ни одному из пациентов не потребовалась дополнительная психологическая помощь, поэтому можно предположить, что такой щадящий вариант стимула мог вызвать другое нейрофизиологическое течение реакции.

Увеличение температуры в периорбитальной области у пациентов с ПТСР в моменты стресса могло быть вызвано усилением активности моргания и ускорением движений глаз, что привело к дополнительному притоку крови к этой области [8]. Повышение температуры лба также могло быть связано с переживанием психоэмоционального стресса. При таком стрессе активируются лобные мышцы, что также приводит к увеличению кровотока [9]. Наиболее чувствительными областями для диагностики в нашем исследовании являются лоб и периорбитальная область. Это противоречит более ранним исследованиям, которые утверждали, что кончик носа и периоральная область являются наиболее показательными [10]. Мы обнаружили сильную положительную корреляцию средних значений температур. Это может иметь значение для разработки комплексных диагностических критериев.

Заключение

Наше исследование подтверждает пригодность сканирующей термографии в качестве метода выявления стрессовой реакции у пациентов с ПТСР. Однако в реальной практике необходимо проводить валидацию как инструмента регистрации реакций, так и используемых стимулов. Дальнейшие исследования и разработки должны быть направлены на устранение ограничений, чтобы обеспечить более точные и надежные результаты при использовании термографии.

Литература

1. Cho Y., Bianchi-Berthouze N. Physiological and Affective Computing through Thermal Imaging: A Survey // 2019.

2. Di Giacinto A. at al. Thermal signature of fear conditioning in mild post traumatic stress disorder // Neuroscience. 2014. Vol. 266. P. 216–223.

3. Kistler A., Mariauzouls C., Berlepsch K. von. Fingertip temperature as an indicator for sympathetic responses // Int. J. Psychophysiol. 1998. Vol. 29. № 1. P. 35–41.

4. Kuraoka K., Nakamura K. The use of nasal skin temperature measurements in studying emotion in macaque monkeys // Physiol/ Behav. 2011. Vol. 102. № 3–4. P. 347–355.

5. Nakayama K. at al. Decrease in nasal temperature of rhesus monkeys (Macaca mulatta) in negative emotional state // Physiol/ Behav. 2005. Vol. 84. № 5. P. 783–790.

6. Liu I. at al. Your blush gives you away: detecting hidden mental states with remote photoplethysmography and thermal imaging // Peer. J. Comput. Sci. 2024. Vol. 10. P. e1912.

7. Henein M. Y. at al. The Impact of Mental Stress on Cardiovascular Health. Part II // J. Clin. Med. 2022. Vol. 11. № 15. P. 4405.

8. Pavlidis I., Levine J., Baukol P. Thermal image analysis for anxiety detection // Proceedings 2001 International Conference on Image Processing (Cat. № 01CH37205). Thessaloniki, Greece: IEEE, 2001. P. 315–318.

9. Mauriz E., Caloca-Amber S., Vázquez-Casares A. M. Effect of Facial Skin Temperature on the Perception of Anxiety: A Pilot Study // Healthcare (Basel). 2020. Vol. 8. № 3. P. 206.

10. Engert V. at al. Exploring the Use of Thermal Infrared Imaging in Human Stress Research // PLoS One. 2014. Vol. 9. № 3. P. e90782.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-323

АССОЦИАЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *SLCO1B1* С ФЕНОТИПОМ СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА *

ASSOCIATION OF SINGLE NUCLEOTIDE VARIANTS OF THE *SLCO1B1* GENE WITH THE GILBERT SYNDROME PHENOTYPE

А. А. Иванова[1], Н. Е. Апарцева[1], А. П. Каширина[1], Е. Г. Немцова[2], Ю. В. Иванова[1], М. В. Кручинина[1], С. А. Курилович[1], В. Н. Максимов[1]

[1]Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск
[2]Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург

A. A. Ivanova[1], N. E. Apartseva[1], A. P. Kashirina[1], E. G. Nemtsova[2], Yu. V. Ivanova[1], M. V. Kruchinina[1], S. A. Kurilovich[1], V. N. Maksimov[1]

[1]Research Institute of Internal and Preventive Medicine — branch of the Institute of Cytology and Genetic SB RAS, Novosibirsk
[2]North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg

✉ ivanova_a_a@mail.ru

Аннотация

Вариант нуклеотидной последовательности rs2306283 гена *SLCO1B1* не ассоциирован с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией. Генотип TC, аллель C однонуклеотидного варианта rs4149056 гена *SLCO1B1* являются генотипом и аллелем риска синдрома Жильбера.

Abstract

The single nucleotide variant rs2306283 of the *SLCO1B1* gene is not associated with benign unconjugated hyperbilirubinemia. The TC genotype, allele C of the single nucleotide variant rs4149056 of the *SLCO1B1* gene is the risk genotype and risk allele for Gilbert syndrome.

Доброкачественная неконъюгированная гипербилирубинемия является широко распространенным состоянием в популяции (частота синдрома Жильбера составляет около 10 %). Наиболее доступным методом ДНК-диагностики синдрома Жильбера является определение количества TA повторов (rs3064744) в промоторе гена *UGT1A1*. При генотипе 7TA/7TA мутации rs3064744 могут не развиваться симптомы синдрома, которые иногда обнаруживаются при генотипах 6TA/7TA или 6TA/6TA этой мутации, что говорит о вероятном вкладе в развитие синдрома также и других мутаций, частых однонуклеотидных вариантов, эпигенетических механизмов [1]. Ген *SLCO1B1* (solute carrier organic anion transporter family member 1B1, 12p12.1) кодирует трансмембранный рецептор, специфический для печени, который участвует в транспорте ряда веществ, включая билирубин [2]. Варианты нуклеотидной последовательности rs2306283 и rs4149056 гена *SLCO1B1* относятся к миссенс-вариантам, исследованы в отношении метаболизма некоторых лекарственных веществ, ассоциации с неонатальной гипербилирубинемией, уровнем общего билирубина, фенотипом синдрома Жильбера [3–7].

Таким образом, **целью исследования является** поиск ассоциации rs2306283 и rs4149056 гена *SLCO1B1* с доброкачественной неконъюгированной гипербилирубинемией.

Материалы и методы

Дизайн исследования «случай — контроль». Группа лиц с фенотипом синдрома Жильбера (СЖ) включает 414 человек (средний возраст 36,7 ± 15,9 лет, 49,8 % мужчин) сформирована врачами-гастроэнтерологами, в нее включены лица с неконъюгированной гипербилирубинемией, прошедшие стандартное клиническое обследование. В группу не включались лица с известными причинами неконъюгированной гипербилирубинемии. Группа контроля (429 человек, средний возраст 39,6 ± 14,7 лет, 54,8 % мужчин) — случайная выборка лиц из банков ДНК участников проекта

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-25-00062).

© А. А. Иванова, Н. Е. Апарцева, А. П. Каширина, Е. Г. Немцова, Ю. В. Иванова, М. В. Кручинина, С. А. Курилович, В. Н. Максимов, 2024

MONICA, скрининга молодых людей 25–44 лет и одномоментного исследования школьников г. Новосибирска.

ДНК была выделена методом фенолхлороформной экстракции или экспресс-методом (ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА, ООО «ДНК-Технология», г. Москва) из венозной крови. Генотипирование групп по вариантам нуклеотидной последовательности rs2306283 и rs4149056 гена *SLCO1B1* проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием наборов ООО «НПФ Синтол» (Россия). Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей, относительный риск по конкретному аллелю или генотипу вычислены с помощью таблиц сопряжтнности с использованием критерия хи-квадрат по Пирсону, точного двустороннего критерия Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$.

Результаты

По частотам генотипов и аллелей rs2306283 гена *SLCO1B1* не найдено статистически значимых различий между группой СЖ и контрольной группой ($p > 0,05$). По частотам генотипов и аллелей однонуклеотидного варианта rs4149056 гена *SLCO1B1* найдены статистически значимые различия между группами ($p = 0,025$): гомозиготный генотип ТТ варианта статистически значимо реже встречается в группе СЖ по сравнению с контрольной группой (ОШ = 0,68, 95%-й ДИ 0,51–0,90, $p = 0,008$); гетерозиготный генотип ТС варианта статистически значимо чаще встречается в группе СЖ по сравнению с контрольной группой (ОШ = 1,45, 95%-й 1,09–1,93, $p = 0,015$); носители аллеля С встречаются чаще в группе СЖ по сравнению с контрольной группой (ОШ = 1,35, 95%-й ДИ 1,07–1,70, $p = 0,015$).

Выводы

Вариант нуклеотидной последовательности rs2306283 гена *SLCO1B1* не ассоциирован с синдромом Жильбера. Генотип ТС, аллель С однонуклеотидного варианта rs4149056 гена *SLCO1B1* являются генотипом и аллелем риска синдрома Жильбера, а генотип ТТ варианта — протективный в отношении синдрома.

Литература

1. King D., Armstrong M. J. Overview of Gilbert's syndrome // Drug Ther. Bull. 2019; 57(2):27-31. DOI: 10.1136/dtb.2018.000028.

2. dbGene SLCO1B1 solute carrier organic anion transporter family member 1B1 [Homo sapiens (human)]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10599.

3. Saber-Ayad M., Manzoor S., El-Serafi A. et al. Statin-induced myopathy SLCO1B1 521T > C is associated with prediabetes, high body mass index and normal lipid profile in Emirati population // Diabetes Res. Clin. Pract. 2018; 139:272-277. DOI: 10.1016/j.diabres.2018.03.014.

4. Liu J. E., Liu X. Y., Chen S. et al. SLCO1B1 521T > C polymorphism associated with rosuvastatin-induced myotoxicity in Chinese coronary artery disease patients: a nested case-control study // Eur. J. Clin. Pharmacol. 2017; 73(11):1409-1416. DOI: 10.1007/s00228-017-2318-z.

5. Lin F., Xu J. X., Wu Y. H. et al. Red Blood Cell Membrane-Related Gene Variants and Clinical Risk Factors in Chinese Neonates with Hyperbilirubinemia // Neonatology. 2023; 120(3):371-380. DOI: 10.1159/000529783.

6. Johnson A. D., Kavousi M., Smith A. V. et al. Genome-wide association meta-analysis for total serum bilirubin levels // Hum. Mol. Genet. 2009; 18(14):2700-10. DOI: 10.1093/hmg/ddp202.

7. Méndez L., Lagoa M., Quiroga T. et al. Prevalencia de síndrome de Gilbert y sus determinantes genéticas en población chilena [Prevalence of Gilbert syndrome and its genetic determinants in Chile] // Rev. Med. Chil. 2013; 141(10):1266-74. Spanish. DOI: 10.4067/S0034-98872013001000005.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-324

ГЕПАТОПРОТЕКТИВНОЕ И АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ОЛЕОИЛЭТАНОЛАМИДА НА МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНО-ИНДУЦИРОВАННОГО ОЖИРЕНИЯ У МЫШЕЙ

HEPATOPROTECTIVE AND ANTIATHEROSCLEROTIC EFFECT OF OLEOYLETHANOLAMIDE-BASED DIETARY SUPPLEMENT IN A MODEL OF ALIMENTARY-INDUCED OBESITY IN MICE

Д. Н. Ивашкевич, И. В. Манжуло, А. И. Пономаренко, И. В. Дюйзен

Национальный научный центр морской биологии им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток

D. N. Ivashkevich, I. V. Manzhulo, A. I. Ponomarenko, I. V. Dyuizen

Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok

✉ owncean@yandex.ru

Аннотация

Диетическая добавка на основе олеоилэтаноламида (OEA-DS) благодаря взаимодействию с рецептором PPAR-α может оказывать комплексное гепатопротективное действие, которое выражается в ингибировании апоптоза гепатоцитов, снижении воспаления и окислительного стресса, а также в регуляции факторов липидного обмена, что делает ее потенциальным кандидатом для использования в комплексной терапии неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП).

Abstract

Dietary supplement based on oleoylethanolamide (OEA-DS) due to its interaction with PPAR-α receptor can exert complex hepatoprotective effect, which is expressed in inhibition of hepatocyte apoptosis, reduction of inflammation and oxidative stress, and regulation of lipid metabolism factors, which makes it a potential candidate for use in the complex therapy of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

Учитывая распространенность ожирения в мире и непрерывную динамику роста заболеваемости сопутствующими метаболическими осложнениями, проблема неалкогольной жировой болезни печени (НАЖБП) становится все более значимой как для пациентов, так и для системы здравоохранения. Как известно, НАЖБП тесно связана как с развитием ожирения [1], так и с метаболическими нарушениями, непосредственно его сопровождающими, такими как гипертония, инсулинорезистентность и гиперхолестеринемия [2, 3, 4].

В настоящее время нет клинически одобренных препаратов конкретно для НАЖБП, и лечение сводится к применению соответствующих диет, пищевых добавок с гепатопротекторным действием, добавлению в рацион липотропных факторов и увеличению физической активности для нормализации веса. Поэтому исследования, направленные на изучение механизмов патогенеза НАЖБП и поиск новых фармакологических мишеней для лечения данного заболевания с целью создания эффективных и безопасных препаратов для профилактики и лечения НАЖБП, являются перспективным направлением в биомедицине. Учитывая все факторы патогенеза и развития НАЖБП, оптимальная терапия должна быть нацелена на подавление воспалительного процесса, гепатоцеллюлярного повреждения и апоптоза, а также торможение процессов фиброза, если заболевание уже находится в стадии прогрессии.

В настоящее время молекулы, являющиеся агонистами рецепторов PPAR, все больше привлекают внимание исследователей, являясь одними из наиболее перспективных кандидатов для комплексной терапии НАЖБП. Потенциал агонистов PPAR хорошо известен в терапевтических областях, связанных с метаболизмом липидов, глюкозы и воспалением, таких как ожирение [5], инсулинорезистентность и атеросклероз [6, 7], на фоне которых зачастую и происходит вторичное повреждение печени.

Олеоилэтаноламид (OEA) относится к группе N-ацилэтаноламидов (NAE), является эндогенным медиатором липидной природы, действие которого связано с активацией вышеупомянутого ядерного рецептора, активируемого пролифератором пероксисом α (PPAR-α) [8]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что OEA принимает участие во множестве патофизиологических аспектов регуляции аппетита, а также липидного и углеводного обмена [9]. В большинстве исследований ОЭА представляет потенциальный интерес в качестве фармакологической мишени для лечения ожирения и расстройств, связанных с пищевым поведением [10]. Доказана его

© Д. Н. Ивашкевич, И. В. Манжуло, А. И. Пономаренко, И. В. Дюйзен, 2024

способность стимулировать чувство сытости и подавлять аппетит как у людей [11], так и у животных с ожирением [12]. Однако появляется все больше экспериментальных подтверждений, что способность ОЭА активировать PPAR-*α* может лежать в основе его гепатопротекторного действия.

Метаболические эффекты биологически активной добавки на основе олеоилэтаноламида (OEA-DS) были изучены на модели ожирения у мышей, вызванного диетой. Развитие алиментарно-индуцированного ожирения сопровождалось выраженными морфологическими изменениями в тканях печени, а также повышением содержания холестерина в плазме крови экспериментальных животных. Воспалительная реакция в печени сопровождалась повышенной продукцией провоспалительных цитокинов, развитием окислительного стресса и апоптозом гепатоцитов. Применение OEA-DS приводило к нормализации уровней холестерина, снижению интенсивности сопровождавшихся уменьшением маркеров воспаления (CD68 и Iba-1) и уровней провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNFα), снижением экспрессии проапоптотических маркеров (Bad, Bax) и уменьшением общего окислительного стресса в печени. Параллельно администрация OEA-DS вызывала усиление экспрессии ядерных рецепторов PPAR- и PPAR- γ, рецепторов к адипонектину 1(AdipoR1) в печени, усиление продукции противоспалительных (CD163) и антиапоптотических (Bcl-2) маркеров. Администрация OEA-DS вызывала индукцию транскрипции генов ферментов липолиза в печени (Acox1, Cpt1a), а также факторов метаболизма холестерина (Ldlr, Furine), одновременно снижая транскрипцию проатерогенного фактора Pcsk9. На культуре клеток гепатокарциномы (HepG2) OEA-DS подавлял окислительный стресс при ЛПС-индуцированном воспалении и способствовал повышению экспрессии PPAR- и PPAR-γ.

Результаты данного исследования свидетельствуют о комплексном действии OEA-DS при поражении печени, ассоциированном с ожирением, которое включает в себя снижение системного воспаления.

Литература

1. Fabbrini E., Sullivan S., Klei, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications // Hepatology. 2010. 51(2). P. 679–689.

2. Kim E. J., Kim B. H., Seo H. S., Lee Y. J., Kim H. H., Son H. H., Choi M. H. Cholesterol-induced non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis aggravated by systemic inflammation // PloS one. 2014. 9(6). e97841.

3. Ng C. H., Wong Z. Y., Chew N. W., Chan K. E., Xiao J., Sayed N., Muthiah M. Hypertension is prevalent in non-alcoholic fatty liver disease and increases all-cause and cardiovascular mortality // Frontiers in Cardiovascular medicine. 2022. 9, 942753.

4. Marchesini G., Brizi M., Morselli-Labate A. M., Bianchi G., Bugianesi E., McCullough A. J., Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance // The American journal of medicine. 1999107(5). P. 450–455.

5. Huang J., Jia Y., Fu T., Viswakarma N., Bai L., Rao M. S., ... & Reddy J. K.. Sustained activation of PPARα by endogenous ligands increases hepatic fatty acid oxidation and prevents obesity in ob/ob mice // The FASEB Journal. 2012. 26(2), 628.

6. Staels B. PPAR agonists and the metabolic syndrome // Therapie, 62(4). 2007319-326.

7. Jain N., Bhansali S., Kurpad A. V., Hawkins M., Sharma A., Kaur S., ... & Bhansali A. Effect of a Dual PPAR α/γ agonist on Insulin Sensitivity in Patients of Type 2 Diabetes with Hypertriglyceridemia-Randomized double-blind placebo-controlled trial // Scientific reports, 9(1), 201919017.

8. Romano A., Coccurello R., Giacovazzo G., Bedse G., Moles A., & Gaetani S. Oleoylethanolamide: a novel potential pharmacological alternative to cannabinoid antagonists for the control of appetite // BioMed Research International, 2014 (1), 203425.

9. Brown J. D., Azari E. K., Ayala J. E.. Oleoylethanolamide: A fat ally in the fight against obesity // Physiology & behavior. 2017. 176. P. 50–58.

10. Laleh P., Yaser K., Alireza, O. (2019). Oleoylethanolamide: A novel pharmaceutical agent in the management of obesity-an updated review. Journal of Cellular Physiology, 234(6). P. 7893–7902.

11. Laleh P., Yaser K., Abolfazl B., Shahriar A., Mohammad A. J., Nazila F., Alireza O. Oleoylethanolamide increases the expression of PPAR-A and reduces appetite and body weight in obese people: a clinical trial. Appetite, 2018. 128. P. 44–49.

12. Oveisi F., Gaetani S., Eng K. T. P., Piomelli D. (2004). Oleoylethanolamide inhibits food intake in free-feeding rats after oral administration // Pharmacological research. № 49 (5). P. 461–466.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-325

ПАРАМЕТРЫ ОБЪЕМОВ КОРКОВЫХ И ПОДКОРКОВЫХ ОБЛАСТЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ ДЕПРЕССИВНЫМ ЭПИЗОДОМ ПОСЛЕ COVID-19 И БЕЗ COVID-19

VOLUME PARAMETERS OF CORTICAL AND SUBCORTICAL BRAIN REGIONS IN PATIENTS WITH PRIMARY DEPRESSIVE EPISODE AFTER COVID-19 AND WITHOUT COVID-19

Н. В. Иерусалимский, Е. Д. Каримова, И. С. Самотаева

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва
Научно-практический психоневрологический центр им. З. П. Соловьева
Департамента здравоохранения города Москвы

N. V. Ierusalimsky, E. D. Karimova, I. S. Samotaeva

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiolog RAS, Moscow
Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Healthcare Department of Moscow

✉ ierusalimskii.nv14@physics.msu.ru

Аннотация

В работе были исследованы параметры структур головного мозга у пациентов с постковидной депрессией по сравнению с группой контроля и пациентами с депрессивным эпизодом. Было проведено МРТ-сканирование, сегментация структур и статистическая обработка. Были обнаружены значимые различия между группами для супрамаргинальной извилины, нижней теменной извилины, парацентральной извилины, энторинальной коры, третьего и латерального желудочков, сосудистого сплетения.

Abstract

The study examined the parameters of brain structures in patients with post-COVID depression compared to the control group and patients with a depressive episode. MRI scanning, segmentation of structures and statistical processing were performed. Significant differences were found between the groups for the supramarginal gyrus, inferior parietal gyrus, paracentral gyrus, entorhinal cortex, third and lateral ventricles, choroid plexus.

В первые месяцы после перенесенного COVID-19 депрессия или тревожное расстройство диагностируются по разным оценкам у 18–30 % пациентов [1].

Гипотеза исследования: COVID-19 приводит к специфическим морфологическим изменениям в головном мозге, которые могут способствовать развитию первичного депрессивного эпизода в рамках постковидного синдрома. Эти изменения, обусловленные нейровоспалением, повреждением микрососудов и иммунными реакциями, значительно отличаются от структурных изменений, наблюдаемых у пациентов с депрессией, не связанной с COVID-19.

Цель исследования: выявить структурные особенности мозга у пациентов, страдающих от первичного депрессивного эпизода после COVID-19, у пациентов с депрессией, не связанной с COVID-19, и у здоровых испытуемых и сравнение их между группами. Основное внимание будет уделено изучению объемов корковых областей и подкорковых структур.

Материалы и методы

Группы испытуемых: 32 пациента с первичной депрессией после перенесенного COVID-19 (средний возраст 49 ± 13 лет), 32 пациена с первичной депрессией (средний возраст 49 ± 18 лет), 32 здоровых испытуемых (средний возраст 49 ± 15 лет). МРТ головного мозга проводили на сканере EXCEL ART VantageAtlas-X (Toshiba, Япония) с индукцией магнитного поля 1,5 Тл в стандартных режимах. Для получения анатомического изображения использовали последовательность T1 3D MP-RAGE Ax (TR = 12 мс, TE = 5 мс, матрица реконструкции — 512 × 512, толщина слоя — 1 мм). Определение морфометрических характеристик структур ГМ проводилось с помощью пакета программ FreeSurfer 7.2.0 (https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/). Далее был применен ковариационный анализ по факторам: группа (контроль, депрессия, COVID-19), пол и ковариант: возраст. Для коррекции эффекта множественных сравнений была применена поправка Холма — Бонферрони. Для апостериорных сравнений был применен критерий Тьюки.

© Н. В. Иерусалимский, Е. Д. Каримова, И. С. Самотаева, 2024

Результаты

У пациентов с постковидной депрессией по сравнению с пациентами с депрессивным эпизодом выявлено: снижение объема супрамаргинальной извилины в левом полушарии, снижение объема нижней теменной извилины и увеличение объема супрамаргинальной извилины в правом полушарии. У пациентов с постковидной депрессией по сравнению со здоровым контролем выявлено: снижение объема парацентральной извилины в левом полушарии и снижение объема энторинальной коры в правом полушарии. У пациентов с депрессивным эпизодом по сравнению со здоровым контролем выявлено: увеличение объема третьего желудочка, левого латерального желудочка и левого сосудистого сплетения.

Выводы

Обнаружено различие морфологических коррелятов для групп пациентов с первичным депрессивным эпизодом по сравнению с группой контроля, а также между пациентами с постковидной депрессией и депрессией в отсутствие COVID-19.

Литература

1. Renaud-Charest O. et al. Onset and frequency of depression in post-COVID-19 syndrome: A systematic review // J. Psychiatr. Res. Elsevier, 2021. Vol. 144. P. 129–137.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-326

СТИМУЛЯЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ С ПОМОЩЬЮ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ МАНЖЕТЫ НА БАЗЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛУПРОВОДНИКОВ *

PERIPHERAL NERVE STIMULATION USING AN IMPLANTABLE CUFF BASED ON ORGANIC SEMICONDUCTORS

Н. Р. Исаев[1], Е. А. Юсуповская[1], Д. В. Телышев[1,2], А. Г. Марков[1,3]

[1]*Институт бионических технологий и инжиниринга Сеченовского университета, Москва*
[2]*Институт биомедицинских систем Национального исследовательского университета «МИЭТ», Зеленоград*
[3]*Центр «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» Сеченовского университета, Москва*

N. R. Isaev[1], E. A. Yusupovskaya[1], D. V. Telyshev[1,2], A. G. Markov[1,3]

[1]*Institute for Bionic Technologies and Engineering. Sechenov University, Moscow*
[2] *Institute of Biomedical Systems National Research University of Electronic Technology, Zelenograd*
[3]*Center "Digital Biodesign and Personalized Healthcare" Sechenov University, Moscow*

✉ n_r_isaev@mail.ru

Аннотация

Представлены результаты проведения *in vitro* и *in vivo* исследований по беспроводной стимуляции поврежденных периферических нервов с помощью полупроводниковой манжеты.

Abstract

The results of *in vitro* and *in vivo* studies on wireless stimulation of injured peripheral nerves using a semiconductor cuff are presented.

Одна из самых распространенных проблем в хирургии на сегодняшний день — повреждение периферических нервов. По разным оценкам только в России в год требуется провести от 4 до 7 тысяч хирургических вмешательств в связи с травмами переферических нервов [1]. Была разработана специальная манжета для беспроводной оптоэлектронной стимуляции, обеспечивающая более быстрое заживление поврежденных нервов. Имплантированные фотоконденсаторы демонстрируют физиологическую стабильность и функциональную стимуляцию периферического нерва в течение нескольких месяцев у животных и не ограничивают их двигательную активность. Кроме того, для работы устройства не требуется никакого источника питания, кроме светового импульса, что исключает риски, связанные с имплантируемым источником энергии. Нейромодуляция осуществляется с помощью проникающего в ткани глубокого красного света (625 нм). Фотоконденсактор представляет собой гибкую полную пленку с золотым электродом (9 нм) и полупроводниковым пикселем [2]. Материалы полупроводника — фталоцианин без металла H2Pc (30 нм) и N,N'-диметилперилен3,4,9,10-тетракарбоновый диимид PTCDI (30 нм).

Для обеспечения эффективной стимуляции клеток необходимо вызвать у них потенциал действия (порог активации −50 мВ). Генерируемый заряд и, следовательно, вызываемый нейронный ответ напрямую зависят от силы и длительности светового импульса. Эти особенности позволяют точно контролировать временные и амплитудные параметры стимуляции, обеспечивают инициацию потенциала действия клеток даже на расстоянии от полупроводникового пикселя.

Эффективность такого фотокондесатора уже доказана в ходе проведения экспериментов *in vitro*. При стимуляции клеточных культур mpf и neuro2A отмечалось увеличение их конфлюентности до 2 раз в сравнении с теми же клеточными культурами без проведения стимуляции. Также отмечалось улучшение проводимости в экспериментах *in vivo* после ежедневной стимуляции в течение трех месяцев рассеченного седалищного нерва у крыс линии Wistar в сравнении с сшитыми рассеченными нервами без проведения стимуляции.

Литература

1. Говенько Ф. С. Хирургия повреждений периферических нервов / Ф. С. Говенько. СПб.: Феникс, 2010. 384 с.

2. Markov A. et al. Multilayered organic semiconductors for high performance optoelectronic stimulation of cells // Nano Research. 2023. Vol. 16. № 4. С. 5809–5816.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 24-15-00496).

© Н. Р. Исаев, Е. А. Юсуповская, Д. В. Телышев, А. Г. Марков, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-327

МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ЦИТОКИНА TRAIL С АНТИАНГИОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ *

MULTIMODAL ANTITUMOR FUSION PROTEINS BASED ON CYTOKINE TRAIL WITH ANTIANGIOGENIC ACTIVITY

А. А. Исакова[1], М. Э. Гаспарян[1], Д. А. Долгих[1,2], А. В. Яголович[1,2]

[1] *Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*
[2] *Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

A. A. Isakova[1], M. E. Gasparian[1], D. A. Dolgikh[1,2], A. V. Yagolovich[1,2]

[1] *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow*
[2] *Lomonosov Moscow State University*

✉ anneyagolovich@gmail.com

Аннотация

В работе исследованы свойства гибридных белков на основе DR5-специфичного цитокина TRAIL с антиангиогенными пептидами на ксенографтных мышиных моделях солидных опухолей человека *in vivo*. Показано, что одновременное воздействие на DR5 и другие рецепторы, гиперэкспрессированные в опухолевом микроокружении, усиливает противоопухолевый эффект за счет дополнительной антиангиогенной активности.

Abstract

The fusion proteins based on the DR5-specific cytokine TRAIL with antiangiogenic peptides were studied in xenograft mouse models of human glioblastoma and pancreatic cancer *in vivo*. It has been shown that simultaneous targeting of DR5 and other receptors overexpressed in the tumor microenvironment enhances the antitumor effect due to additional antiangiogenic activity.

Препараты на основе DR5-направленного цитокина TRAIL перспективны для таргетной терапии рака благодаря способности индуцировать апоптоз при связывании с рецептором смерти DR5 на поверхности опухолевых клеток. Цель работы заключалась в разработке и исследовании мультимодальных гибридных белков на основе DR5-селективного варианта цитокина TRAIL DR5-B для параллельного воздействия на опухолевые клетки и опухолевое сосудистое микроокружение.

Были разработаны биспецифичные гибридные белки на основе лиганда DR5-B с эффекторными пептидами: SRH (SRHTKQRHTALH) с антиангиогенным действием за счет аффинности к рецептору VEGFR2, и iRGD (CRGDKGPDC), усиливающим проникновение в солидные опухоли за счет специфичности к интегринам αvβ3/5 и NRP-1 по механизму CendR. По данным иммуноферментного анализа, гибридные белки с пептидом SRH проявили аффинность в наномолярном диапазоне к рецепторам DR5 и VEGFR2, а с пептидом iRGD — к DR5 и интегрину αvβ3. Методом конфокальной микроскопии было показано, что пептид iRGD в составе гибридных белков способствовал ускоренному проникновению в мультиклеточные сфероиды линии глиобластомы человека U87MG [1].

Все варианты гибридных белков обладали повышенной цитотоксической активностью *in vitro* на клеточных линиях солидных опухолей человека различного происхождения, гиперэкспрессирующих на поверхности рецепторы DR5, VEGFR2 и интегрин αvβ3, а также обладали аффинностью к эндотелиальным клеточным линиям bEnd.3 и HBEC5i.

Противоопухолевое действие гибридных белков *in vivo* тестировали на ксенографтных мышиных моделях солидных васкуляризованных опухолей человека различного происхождения. Все варианты гибридных белков тормозили рост опухолевых ксенографтов эффективнее, чем исходный DR5-специфичный TRAIL: диапазон торможение роста опухоли (ТРО) для наиболее эффективной модификации SRH-DR5-B-iRGD составил 75–85 % по сравнению с 50–55 % для DR5-B [2].

Васкуляризацию опухолевой паренхимы исследовали с помощью иммуногистохимического анализа путем окрашивания на эндотелиальные маркеры CD31 и CD34 и других методик. Наиболее перспективная модификация белка SRH-DR5-B-iRGD приводила к снижению плотности сосудистой сети в опухолевых узлах до 50 %.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 24-14-00250).

© А. А. Исакова, М. Э. Гаспарян, Д. А. Долгих, А. В. Яголович, 2024

Таким образом, модификация DR5-специфичного варианта TRAIL эффекторными пептидами придает ему дополнительную антиангиогенную активность и усиливает противоопухолевый эффект за счет одновременной активации рецептора смерти DR5 на поверхности опухолевых клеток и блокирования рецепторного комплекса VEGFR2/NRP-1/интегрин αvβ3/5 в опухолевом сосудистом микроокружении. Новый мультимодальный гибридный белок SRH-DR5-B-iRGD может обладать клиническими перспективами для таргетной терапии солидных васкуляризованных опухолей.

Литература

1. Yagolovich A. V., Isakova A. A. et al. DR5-Selective TRAIL Variant DR5-B Functionalized with Tumor-Penetrating iRGD Peptide for Enhanced Antitumor Activity against Glioblastoma // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23(20). P. 12687.

2. Isakova A. A., Artykov A. A. et al. Dual targeting of DR5 and VEGFR2 molecular pathways by multivalent fusion protein significantly suppresses tumor growth and angiogenesis // Int. J. Biol. Macromol. 2024. Vol. 255. P. 128096.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-328

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОСТИ МРНК-КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ RBD БЕЛКА S ВИРУСА SARS-COV-2 И ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА ТИПА А (H1N1), ДОСТАВЛЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНЫХ И ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ*

COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOGENICITY OF MRNA CONSTRUCTS ENCODING RBD PROTEIN S OF SARS-COV-2 VIRUS AND HEMAGGLUTININ OF INFLUENZA TYPE A (H1N1) VIRUS DELIVERED BY MAGNETIC AND LIPID NANOPARTICLES

Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, В. А. Яковлев, С. В. Шарабрин, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, Е. В. Тигеева, А. П. Рудометов, А. А. Ильичев, Л. И. Карпенко

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

L. A. Kisakova, D. N. Kisakov, V. A. Yakovlev, S. V. Sharabrin, M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina, E. V. Tigeeva, A. P. Rudometov, A. A. Ilyichev, L. I. Karpenko

State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Koltsovo

✉ *orlova.lyub1996@yandex.ru*

Аннотация

Использование липидных наночастиц для доставки мРНК-вакцин, кодирующих RBD белка S вируса SARS-COV-2 и гемагглютинин вируса гриппа типа А (H1N1) привело к значительному увеличению гуморального и Т-клеточного ответа. Однако применение магнитных наночастиц не показало активации обоих звеньев иммунного ответа и нуждается в дальнейшей оптимизации способа доставки мРНК-вакцин.

Abstract

The use of lipid nanoparticles for the delivery of mRNA vaccines encoding the SARS-COV-2 virus RBD protein S and the influenza A (H1N1) virus hemagglutinin produced a significant increase in humoral and T-cell responses. However, the application of magnetic nanoparticles did not show activation of both parts of the immune response and needs further optimization of the mRNA vaccine delivery method.

Пандемия SARS-CoV-2 способствовала выходу на рынок новых вакцинных платформ, в том числе и на основе мРНК. К преимуществам мРНК-вакцин можно отнести их способность индуцировать как гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ. Основным недостатком мРНК-вакцин является их низкая иммуногенность при внутримышечном введении в виде «голой» мРНК. Для преодоления данной проблемы был разработан ряд подходов, включая упаковку в липидные наночастицы, поликатионные полимеры, электропорацию и безыгольную инжекцию.

Целью исследования стал сравнительный анализ иммуногенности ранее разработанных в отделе биоинженерии мРНК-конструкций, кодирующих RBD белка S вируса SARS-CoV-2 и гемагглютинин вируса гриппа типа А (H1N1), доставленных с использованием магнитных (MNP) и липидных наночастиц (LNP).

Мышей линии BALB/c иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом в 21 день. Эффективность доставки мРНК-конструкции mRNA-RBD, кодирующей рецептор связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, оценивали на 10-е сутки после второй иммунизации. С помощью ИФА было показано, что использование липидных наночастиц привело к высокой активации гуморального иммунного ответа (средний титр RBD-специфичных антител 1:6889050) по сравнению с группой животных, иммунизированных в/м «голой» мРНК-вакциной (титр 1:44550). При анализе Т-клеточного иммунного ответа с использованием метода ELISpot показано, что наибольшее количество клеток, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию RBD-специфическими пептидами, было обнаружено у группы мышей, иммунизированных mRNA-RBD-LNP (588 спотообразующих единиц) по сравнению с группой животных, иммунизированных «голой» mRNA-RBD (257 спотообразующих единиц). Однако при использовании магнитных наночастиц показана активация гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на уровне группы животных, иммунизированных в/м «голой» мРНК-вакциной.

Аналогично эффективность доставки мРНК-конструкции mRNA-H1, кодирующей гемагглютинин виру-

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

© Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, В. А. Яковлев, С. В. Шарабрин, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, Е. В. Тигеева, А. П. Рудометов, А. А. Ильичев, Л. И. Карпенко, 2024

са гриппа A (H1N1) с использованием липидных и магнитных наночастиц оценивали на 10-е сутки после второй иммунизации. При использовании липидных наночастиц с помощью ИФА было показано, что средний титр H1-специфичных антител составлял 1:473850 по сравнению с группой животных, иммунизированных «голой» мРНК-вакциной в/м (титр 1:115650). При анализе Т-клеточного иммунного ответа с использованием метода ELISpot было продемонстрировано, что наибольшее количество клеток, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию H1-специфическими пептидами, было обнаружено у мышей, иммунизированных mRNA-H1-LNP (1009 спотообразующих единиц) по сравнению с группой животных, иммунизированных «голой» mRNA-H1 (178 спотообразующих единиц). Использование магнитных наночастиц также не привело к активации гуморального и Т-клеточного иммунного ответа по сравнению с группой животных, иммунизированных внутримышечно «голой» мРНК-вакциной.

Таким образом, использование липидных наночастиц для доставки мРНК-вакцин лабораторным животным значительно индуцирует как гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ по сравнению с группой животных, иммунизированных внутримышечно «голой» мРНК-вакциной. Однако применение магнитных наночастиц не привело к активации обоих звеньев иммунного ответа, и данная система доставки мРНК-вакцин нуждается в дальнейшей оптимизации.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-329

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ TRAIL-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА *

PROINFLAMMATORY ACTIVATION SUPPRESSES TRAIL-INDUCED APOPTOSIS OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS

М. И. Кобякова[1,2], А. С. Сенотов[2], Я. В. Ломовская[2], К. С. Краснов[2], Е. И. Фетисова[2], Р. С. Фадеев[2]

[1]*НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск*
[2]*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*

M. I. Kobyakova[1,2], A. S. Senotov[2], Ya.V. Lomovskaya[2], K. S. Krasnov[2], E. I. Fetisova[2], R. S. Fadeev[2]

[1]*Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino*

✉ kobyakovami@gmail.com

Аннотация

Исследование механизмов резистентности клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета остается крайне актуальной задачей. В работе описан новый механизм TRAIL-резистентности клеток ОМЛ, основанный на провоспалительной клеточной активации, сопровождающейся изменением поверхностной экспрессии проапототических TRAIL-рецепторов, содержания адапторного белка FADD и антиапоптотических факторов cFLIPS, Livin и cIAP2.

Abstract

The study of the mechanisms of resistance of AML cells to the action of antitumor immunity mediators remains an extremely urgent task. The paper describes a new mechanism of TRAIL resistance of AML cells based on proinflammatory cellular activation accompanied by changes in the surface expression of proapototic TRAIL receptors, the content of the FADD adaptive protein and antiapoptotic factors cFLIPS, Livin and cIAP2.

Ранее в наших работах было показано повышение устойчивости клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) к TRAIL-индуцированной гибели при их ЛПС-зависимой провоспалительной активации и в *in vitro* модели ЛПС-независимой провоспалительной активации — в долговременной культуре клеток высокой плотности. Известно, что нарушение регуляции гуморальных медиаторов воспаления при ОМЛ может создавать микроокружение, активирующее пролиферацию, выживаемость и лекарственную устойчивость лейкозных клеток. Также хорошо известно, что провоспалительные цитокины и ростовые факторы могут повышать устойчивость клеток ОМЛ к клеточной гибели за счет активации воспалительных сигнальных путей, регулирующих внутриклеточное содержание антиапоптотических белков. В тоже время механизмы резистентности клеток ОМЛ к TRAIL-индуцированной гибели, опосредованные воспалением, остаются неизвестными.

В данной работе исследовали влияние провоспалительной активации клеток ОМЛ на активацию внутриклеточного проапототического сигнального пути TRAIL.

В работе использовали клетки острого миелоидного лейкоза человека линии THP-1 (ATCC, США), которые культивировали в питательной среде RPMI-1640 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Клетки высевали по 5×10^4 кл/мл в лунки U-образного 96-луночного культурального планшета. Через 1 сутки после посева количество клеток в лунке увеличивалось до 1×10^5 кл/мл, и мы использовали их как культуры низкой плотности (THP-1НПК). Через 5 суток культивирования без смены питательной среды количество клеток в лунке вырастало до 1×10^6 кл/мл, формируя трехмерный многоклеточный агрегат — высокоплотную клеточную культуру (THP-1ВПК). Для активации провоспалительного фенотипа (THP-1ЛПС) клетки THP-1 обрабатывали 10 мкг/мл липополисахарида (ЛПС) из *E. Coli* O111:B4 (Sigma, США) в течение 24 часов. Анализ поверхностной экспрессии рецепторов к TRAIL и содержания cleaved PARP1/2 проводили методом проточной цитометрии на приборе BD Accuri C6 (BD Bioscience, США) с использованием соответствующих моноклональных антител. Анализ ферментативной активности каспазы-3 проводили с помощью коммерческого набора Caspase-3 Activity Assay Kit (Cell Signaling Technology, США) на спектрофотометре Infinite F200

* Работа выполнена в рамках государственного задания № FWNR-2022-0001.

© М. И. Кобякова, А. С. Сенотов, Я. В. Ломовская, К. С. Краснов, Е. И. Фетисова, Р. С. Фадеев, 2024

(Tecan, Швейцария). Содержание белков FADD, cFLIP, прокаспазы и каспазы 8, Bid и tBid в клетках определяли методом вестерн-блота. Уровень экспрессии мРНК генов белков NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8 определяли методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Результаты представляли в виде среднего ± стандартное отклонение. Опыты проводили не менее чем в трех повторах. Статистическую значимость отличия определяли с помощью одностороннего ANOVA с последующим множественным сравнением Холма — Сидака.

Анализ экспрессии проапототических рецепторов показал снижение числа клеток, несущих TRAIL-R1 и TRAIL-R2, в культуре TRAIL-резистентных клеток THP-1ВПК и THP-1ЛПС, обладающих провоспалительным фенотипом, по сравнению с чувствительными к действию TRAIL неактивированными клетками THP-1НПК. Для клеток THP-1ВПК также было выявлено снижение поверхностной экспрессии TRAIL-R1. При исследовании активации внутриклеточного проапототического сигнального пути TRAIL было выявлено снижение содержания активной каспазы 8 в клетках THP-1ВПК и THP-1ЛПС на фоне снижения содержания белка FADD, а также повышения содержания cFLIPS и прокаспазы 8 по сравнению с клетками THP-1НПК. Также было показано, что в клетках THP-1ВПК после обработки izTRAIL существенно ниже ферментативная активность каспазы 3, содержание tBid и число клеток, содержащих cleaved PARP1/2, а также повышался уровень экспрессии гена белка Livin в сравнении с клетками THP-1НПК. В свою очередь, в клетках THP-1ЛПС после обработки izTRAIL мы не обнаружили tBid, cleaved PARP1/2 и изменений в ферментативной активности каспазы 3, однако выявили повышение уровня экспрессии гена белка cIAP2 относительно клеток THP-1НПК.

Таким образом, представленные результаты указывают на то, что повышение резистентности к TRAIL-индуцированной гибели у клеток ОМЛ THP-1 при их провоспалительной активации может реализоваться через снижение поверхностной экспрессии проапототических TRAIL-рецепторов, содержания адапторного белка FADD, а также повышение содержания антиапоптотического фактора cFLIPS и представителей семейства IAPs — Livin и cIAP2. Результаты этой статьи открывают новые представления о роли воспаления в формировании устойчивости клеток ОМЛ к действию медиаторов противоопухолевого иммунитета, в частности, TRAIL.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-330

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ПЕПТИДОВ БЛОКИРОВАТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОР НА ПРИМЕРЕ КОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ CTLA4-B7-2

STUDY OF THE ABILITY OF PEPTIDES TO BLOCK LIGAND-RECEPTOR INTERACTION USING THE EXAMPLE OF COREGULATORY MOLECULES CTLA4-B7-2

Е. А. Колосова[1,2], П. В. Колосов[2], Д. Н. Щербаков[1,2]

[1]Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово
[2]Алтайский государственный университет, Центр рекомбинантных технологий, Барнаул

E. A. Kolosova[1,2], P. V. Kolosov[2], D. N. Shcherbakov[1,2]

[1]State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo
[2]Altai State University, Center of Recombinant Technologies, Barnaul

✉ natdobryak@gmail.com

Аннотация

Определена константа диссоциации реакции лиганд-рецептор коммерческих молекул hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) в прямом твердофазном иммуноферментном анализе. Определены условия полумаксимальной ингибирующей концентрации hCTLA-4-Fc (CD152) в прямом твердофазном иммуноферментном анализе. Проведена оценка ингибирующих способностей пептидов: p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ), отобранных с помощью аффинной селекции в конкурентном иммуноферментном анализе.

Abstract

The ligand-receptor dissociation reaction constant of the commercial molecules hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) was determined by direct ELISA. The conditions for achieving the half-maximal inhibitory concentration of hCTLA-4-Fc (CD152) in a direct ELISA were determined. The inhibitory abilities of peptides p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) and p108 (QMPALMQQ), selected by affinity selection, were assessed in a competitive ELISA.

Снижение показателя смертности от онкологических заболеваний подразумевает два пути. Во-первых, это поиск новых способов диагностики, которые в полной мере и на ранних стадиях позволят диагностировать заболевания. Во-вторых, это разработка терапевтических препаратов, которые могут дать отпор раковым клеткам. Одними из таких препаратов являются пептиды. Их поиск и использование как средство в иммунотерапии является актуальной задачей. Ранее учеными из Российско-американского противоракового центра (РАПРЦ) были найдены пептиды, которые специфически взаимодействуют с молекулами иммунного ответа [1].

Работа с пептидами как с молекулами, препятствующими образованию нежелательного иммунного ответа, открывает большие возможности для успешного лечения рака. Использование таких пептидов путем разрушения взаимодействия hCTLA-4-Fc (CD152) — hB7-2 (CD86) позволит добиться успешных результатов и выйти на новый уровень в иммунотерапии.

Таким образом, целью данного исследования было оценить способность пептидов p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ) блокировать взаимодействие корегуляторных молекул hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) с помощью иммуноферментного анализа.

Константы диссоциации между антигеном активации В-лимфоцитов hB7-2 (CD86) (CD86) и гликопротеином цитотоксических Т-лимфоцитов 4 hCTLA-4-Fc (CD152) определяли с помощью прямого ИФА.

Для иммуноферментного анализа использовали высокосорбционные 96-луночные планшеты (Sovtech, Россия). Препарат hB7-2 (CD86) (R&D Systems, США) сорбировали 500 нг/лунка в НФР в объеме 100 мкл/лунка при 4 °С в течение ночи. После блокировали блокирующим раствором, содержащим 1% сухое молоко (PanReac AppliChem, Испания) в НФР в объеме 150 млк/лунка в течение 1 часа при 37 °С в термошейкере. Далее троекратно промыли на вошере (BioTek, Россия) промывочным раствором, содержащим 0,05% полисорб 20 в НФР с pH 7,3.

Далее добавили препарат hCTLA-4-Fc (CD152), содержащий константную область человека, в диапазоне от 500 нг/лунка до 15,26 нг/лунка и инкубировали в термошейкере 2 часа при 37 °С. В качестве положительного контроля использовали препарат «Иммуноглобулин человека нормальный» («Микроген», Россия). После трое-

© Е. А. Колосова, П. В. Колосов, Д. Н. Щербаков, 2024

кратно промыли на вошере (BioTek, Россия) промывочным раствором, содержащим 0,05% полисорб 20 в НФР с pH 7,3.

Конъюгат вторичных козьих антител против константной области человеческого антитела, меченого пероксидазой хрена, наносили в разведении 1:10000 в блокирующем растворе по 100 мкл/лунка и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С в термошейкере. После шестикратной промывки инкубировали с раствором ТМБ по 50 мкл/лунка в течение 20 минут при комнатной температуре и остановили реакцию добавлением 1М H2SO4. Регистрацию сигнала проводили при 450 нм на спектрофотометре (Bio-Rad, США).

Константой диссоциации является та концентрация лиганда (hCTLA-4-Fc (CD152)), при которой половина рецепторов (hB7-2 (CD86)) занята и соответствует концентрации 125 нг/лунка hCTLA-4 (CD152) (рис. 1). Таким образом, оптимальными условиями для ИФА с полумаксимальной ингибирующей концентрацией является концентрация 125 нг/лунка hCTLA-4-Fc (CD152) при концентрации hB7-2 (CD86) 500 нг/лунка и разведении конъюгата вторичных антител 1:10000.

Для количественной оценки влияния пептидов на взаимодействие между молекулами hB7-2 (CD86) и hCTLA-4-Fc (CD152) использовали конкурентный ИФА.

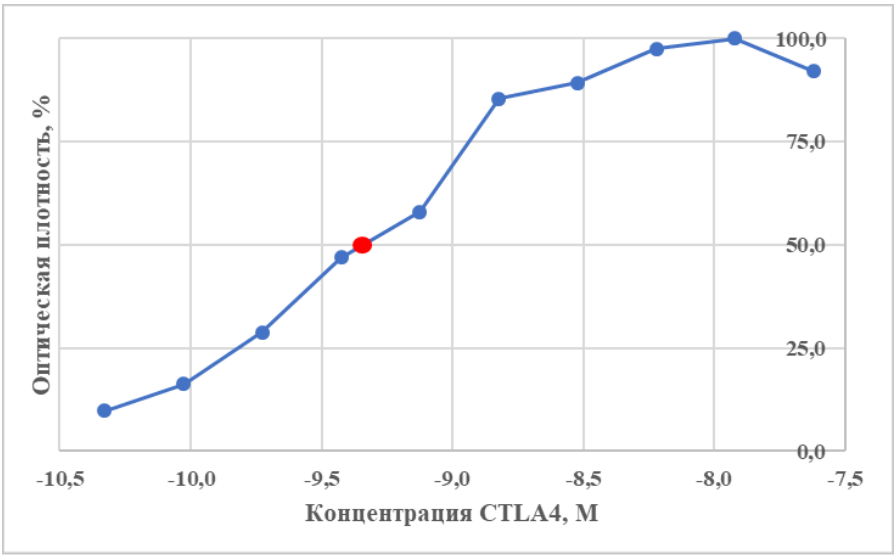


Рис. 1. Зависимость доли связанных молекул hB7-2 (CD86) от десятичного логарифма соответствующей концентрации hCTLA-4-Fc (CD152). Красной точкой отмечена константа диссоциации

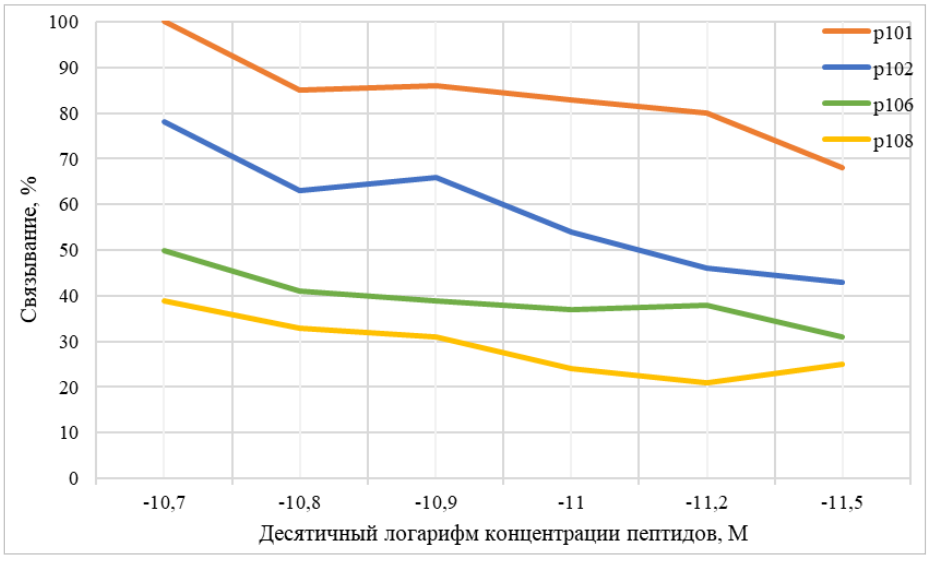


Рис. 2. Зависимость доли связанных молекул hB7-2 (CD86) от десятичного логарифма соответствующей концентрации пептидов

На рис. 2 отражена зависимость доли связанных молекул hB7-2 (CD86) от десятичного логарифма соответствующей концентрации пептидов p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ).

Константа диссоциации реакции лиганд-рецептор коммерческих молекул hB7-2 (CD86) — hCTLA-4-Fc (CD152) в прямом твердофазном ИФА соответствует концентрации 125 нг/лунка hCTLA-4 (CD152). Оптимальными условиями для ИФА с полумаксимальной ингибирующей концентрацией является концентрация 125 нг/лунка hCTLA-4-Fc (CD152) при концентрации hB7-2 (CD86) 500 нг/лунка и разведении конъюгата вторичных антител 1:10000. Проведена оценка ингибирующей способности пептидов: p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) и p108 (QMPALMQQ). Пептид p108 (QMPALMQQ) показал наилучший результат связывания с молекулами hB7-2 (CD86), чем пептиды p101 (CLARCLGRC), p102 (CPSASSQLTC), p106 (AHIEVVSP) на 60, 49 и 22 % соответственно.

Литература

1. Kolosova E.A. et al. Search for Peptides Specifically Binding with the B7-2 Costimulatory Molecule // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2021. Vol. 47. P. 1220–1224.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-331

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДОМИМЕТИКА КАМП-1 *

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF THE USE OF A NEW ANTIMICROBIAL PEPTIDOMIMETIC SAMP-1

Е. М. Любушкина[1], Е. А. Бондарева[1,2], М. С. Солдатова[1], Д. В. Ярославцев[1]

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

E. M. Lyubushkina[1], E. A. Bondareva[1,2], M. S. Soldatova[1], D. V. Yaroslavtsev[1]

[1]Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of the ICG SB RAS, Novosibirsk
[2]Novosibirsk State Medical University

✉ lizaveta.lyubushkina@list.ru

Аннотация

Развитие резистентности к антибиотикам у бактерий является одной из основных проблем в современном мире и одной из самых больших угроз, с которыми сталкивается человечество. Поиск альтернативных противомикробных молекул привел к изучению антимикробных природных пептидов, на основе которых создаются синтетические пептидомиметики, которые обладают большей устойчивостью к протеолизу, метаболической стабильностью, меньшей гематотоксичностью.

В лаборатории АО «СЦФБ» был синтезирован короткий катионный пептидомиметик КАМП-1. Пептидомиметик не имеет микробной мишени, он взаимодействует за счет электростатических сил с мембраной микробных тел, вызывая перфорирование мембраны и потерю электролитов, приводящей к гибели прокариот. При помощи метода серийных разведений было установлено, что для аттестованных штаммов бактерий и грибов минимальная ингибирующая концентрация не превышала 100 мг/л, что делает его перспективным для дальнейшего изучения. При проведении эксперимента по острой токсичности был установлен диапазон токсических доз для мышей — 7,5–10,0 мг/кг и для крыс — 4,5–5,5 мг/кг. Токсический эффект проявлялся в течение первых нескольких минут и приводил к гибели подопытных, выжившие имели признаки здорового экстерьера, физиологическую прибавку веса. По истечении 14 дней выжившие испытуемые подвергались эвтаназии, при вскрытии у животных не было зафиксировано на макропрепаратах признаков токсического воздействия. Животные, погибшие в ходе эксперимента, при макроскопии имели признаки дистрибутивного шока. Результаты токсичности ведут к следующему этапу исследования КАМП-1 на культуре клеток для более детального изучения взаимодействия с мембраной эукариот.

Abstract

The development of antibiotic resistance in bacteria is one of the major problems in the modern world and one of the greatest threats facing humanity. The search for alternative antimicrobial molecules has led to the study of natural antimicrobial peptides, which serve as the basis for creating synthetic peptidomimetics. These synthetic versions are more resistant to proteolysis, have greater metabolic stability, and exhibit less hematotoxicity.

The short cationic peptidomimetic SAMP-1 was synthesized in the laboratory of JSC “SCPB”. Peptidomimetics do not have a specific microbial target; instead, they interact with microbial membranes through electrostatic forces, causing membrane perforation and electrolyte loss, which leads to the death of prokaryotes. Using the serial dilution method, it was determined that the minimum inhibitory concentration for certified strains of bacteria and fungi did not exceed 100 mg/L, making it promising for further study. In the acute toxicity experiment, the range of toxic doses was determined to be 7,5–10,0 mg/kg for mice and 4,5–5,5 mg/kg for rats. The toxic effect manifested within the first few minutes and led to the death of the test subjects; survivors showed signs of a healthy appearance and physiological weight gain. After 14 days the surviving test subjects were euthanized, and no signs of toxic effects were observed in the macroscopic examination of the animals. Animals that died during the experiment exhibited signs of distributive shock upon macroscopic examination. The toxicity results prompt the next stage of research on SAMP-1 using cell cultures to study its interaction with eukaryotic membranes in more detail.

Введение

Способность микроорганизмов образовывать антибиотик без навыка быть устойчивым к нему не имеет смысла. В борьбе с устойчивостью к антибиотикам человечество проигрывает. Сейчас существует серьезная угроза перехода в постантибиотический мир. Поиск новых альтернативных молекул антибиотикам привел к синтетическим пептидомиметикам, которые берут идею своего происхождения от природных антимикробных пепти-

* Работа выполнена по теме государственного задания № FWNR-2024-0005.

© Е. М. Любушкина, Е. А. Бондарева, М. С. Солдатова, Д. В. Ярославцев, 2024

дов, являющимися представителями врожденного иммунитета у всех животных. В лаборатории АО «СЦФБ» синтезировали инновационный короткий катионный пептидомиметик КАМП-1, требующий дальнейшего изучения.

Цель исследования — изучить противомикробную активность и параметры острой токсичности КАМП-1.

Материалы и методы

КАМП-1 состоит из трех L-аминокислот, две из которых синтетические. Является амфифильной молекулой с положительным зарядом и через электростатическое взаимодействие связывается с мембраной микроорганизма, которая имеет отрицательный заряд, это приводит к образованию пор в мембране микроорганизма, отток анионов, деполяризацию мембраны и гибель микроорганизма.

Антимикробную активность КАМП-1 определяли при помощи метода серийных разведений пептидомиметика с использованием тест-культур сертифицированных штаммов бактерий и грибов с определением минимальной ингибирующей концентрацией (МИК). Провели исследование острой токсичности на двух видах грызунов: крысах и мышах. Раствор КАМП-1 в различных концентрациях однократно внутривенно вводили лабораторным животным и ежедневно наблюдали за ними в течение 14 дней. Высчитывали при помощи программа StatPlus диапазон летальных доз.

Результаты

КАМП-1 продемонстрировал ингибирующую способность к аттестационным штаммам. Согласно ВОЗ, вещество является перспективным антимикробным средством в случае, если его МИК не превышает 100 мг/л. Пептидомиметик имел МИК для сертифицированных грам «+» штаммов (S. aureus ATCC 6538, B. cereus ATCC 10702, Corynebacterium hoffmani K22) в 15 раз меньше, для грам «–» штаммов Escherichia coli ATCC 25922 в 12 раз меньше, а для Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 в 1,67 раз меньше, для штаммов грибов (Candida albicans NCTC 885-653, Candida glabrata KY22, Candida parapsilosis KY23, Candida krusei PY22, Candida tropicalis PY23) от 1,25–2,5 раза меньше максимально допустимого предела, что делает его перспективной фармацевтической субстанцией с антибактериальным и противогрибковым действием.

При проведении эксперимента по острой токсичности максимальная концентрация КАМП-1, при которой не регистрировали гибель мышей и крыс, были 7,0 мг/кг и 4,0 мг/кг соответственно. У аутбредных мышей в диапазоне доз 7,5–10,0 мг/кг и у аутбредных крыс 4,5–5,5 мг/кг регистрировался токсический эффект, который проявлялся гибелью животных в течение первых минут после введения вещества. Симптомы токсического воздействия были однотипны и имели последовательность в проявлении: заторможенность реакции, сохранение естественного положения — на четырех лапах, нереагирование на звуковые раздражители, отказ от еды и воды, учащенное дыхание по типу грудо-брюшного и последующее возникновение клинических судорог. Некоторые испытуемые восстанавливали витальные функции: в диапазоне доз 7,5–9,5 мг/кг у мышей и 4,5–5,0 мг/кг у крыс. Между самками и самцами не было разницы при воздействии КАМП-1. При вскрытии не были выявлены макроскопические изменения внутренних органов (легкие, сердце, печень, головной мозг, селезенка, кишечник). Гибель животных в эксперименте наступала от дистрибутивного шока, вероятнее всего, спровоцированного пептидомиметиком при взаимодействии с рецепторным аппаратом эндотелия. Результаты по выявленным летальным дозам исследуемой субстанции представлены в таблице.

Параметры острой токсичности после однократного внутривенного введения КАМП-1 у лабораторных животных

Группа животных	LD_{10}, мг/кг	LD_{50}, мг/кг	LD_{90}, мг/кг
Аутбредные мыши	7,48	8,88	10,28
Аутбредные крысы	4,11	4,63	5,16

Требуется дальнейшее изучение КАМП-1 в формате требований регистрационного досье лекарственного препарата.

Выводы

1. КАМП-1 является перспективным противомикробным средством, что подтверждается МИК, не превышающей 100 мг/л в отношении грам «+» и грам «–» штаммов, а также штаммов грибов.

2. У КАМП-1 регистрируется дозозависимый летальный эффект и диапазон остротоксических доз для мышей 7,5–10 мг/кг и для крыс 4,5–5,5 мг/кг.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-332

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИ-ИОННОГО ЗАМЕЩЕНИЯ В СТРУКТУРЕ ГИДРОКСИАПАТИТА НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАТЕРИАЛА*

EFFECT OF MULTI-ION SUBSTITUTION IN THE STRUCTURE OF HYDROXYAPATITE ON THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE MATERIAL

С. В. Макарова[1], Н. В. Булина[1], М. В. Хвостов[1,2], И. А. Бородулина[1]

[1]*Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, Новосибирск*
[2]*Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН*

S. V. Makarova[1], N. V. Bulina[1], M. V. Khvostov[1,2], I. A. Borodulina[1]

[1]*Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, Novosibirsk*
[2]*Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS*

✉ makarova@solid.nsc.ru

Аннотация

Гидроксиапатит известен как основной компонент костной ткани человека. Благодаря этому, он широко применяется в хирургии для регенерации костной ткани и при изготовлении имплантатов. Включение различных ионов в кристаллическую решетку гидроксиапатита позволяет усиливать или модифицировать свойства материала. В данной работе рассматривалось влияние мульти-ионных замещений в структуре гидроксиапатита на биологические свойства материала.

Abstract

Hydroxyapatite is the primary component of human bone tissue and is therefore widely employed in surgical procedures for bone regeneration and the fabrication of implants. The incorporation of diverse ions into the crystal lattice of hydroxyapatite enables the enhancement or modification of the material's properties. In this study, we investigated the impact of multi-ion substitutions in the structure of hydroxyapatite on the biological properties of the material.

Заболеванием опорно-двигательной системы, связанным с костным скелетом человека и развивающимся в результате остеопороза, злокачественных новообразований и травм, страдают порядка 40 % населения России, что приводит к необходимости разработки новых материалов для изготовления искусственных имплантатов при замене костных участков, а также порошков и гранул для нанесения покрытий на металлические имплантаты или для локального восстановления костного дефекта. Материалы должны эффективно влиять на формирование новой костной ткани после операций по удалению пораженных участков кости и ускорять процесс заживления костных дефектов, а также обладать антибактериальным потенциалом.

Гидроксиапатит (ГА) с химической формулой $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ является главным минеральным компонентом костной и зубной тканей человека и животных. В связи с этим он широко применяется в челюстно-лицевой хирургии и ортопедии для восстановления дефектов костных и зубных тканей, а также при производстве имплантатов. Однако незамещенный ГА не обладает антибактериальной активностью, имеет низкую скорость биорезорбции и остеогенеза. Введение различных ионов-заместителей в структуру ГА позволят улучшить характеристики. Например, присутствие ионов магния, цинка или железа в структуре ГА положительно влияет на жизнеспособность, адгезию и пролиферацию клеток остеобластов, а также стимулирует остеогенную активность, сцепление материала с костью и заживление. Введение ионов серебра или лантана придает материалу антибактериальные и противовоспалительные свойства. Введение силикат-ионов в структуру ГА приводит к улучшению механических свойств, ускорению биорезорбции материала по сравнению с незамещенным ГА [1]. Можно предположить, что одновременное введение нескольких ионов в структуру ГА позволит получить материал с комбинированными свойствами.

Целью работы было определение влияния мульти-ионного замещения в структуре ГА на свойства материала.

Механохимическим методом синтеза были получены катион-анион-замещенные ГА (см. таблицу) в течение 40 минут в планетарной мельнице АГО-2. Был проведен ряд *in vitro* и *in vivo* исследований по изучению свойств полученных соединений.

* Работа выполнена в рамках государственного задания ИХТТМ СО РАН (проект № 121032500064-8).

© С. В. Макарова, Н. В. Булина, М. В. Хвостов, И. А. Бородулина, 2024

Химические формулы замещенных ГА

Замещенный ГА	Химическая формула
La-Si	$Ca_{10-x}La_x(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}O_{x/2}$, где x = 1 – 6
Zn-Si	$Ca_{10-x}Zn_x(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$, где x = 0,2 – 2
Fe-Si	$Ca_{10-x}Fe_x(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}O_{x/2}$, где x = 0,2 – 2
Ag-Zn-Si	$Ca_{9,8}Ag_{0,1}Zn_{0,1}(PO_4)_{5,8}(SiO_4)_{0,2}(OH)_{1,7}$
Zn-Mg-Si	$Ca_{9,4}Zn_{0,1}Mg_{0,5}(PO_4)_{5,8}(SiO_4)_{0,2}(OH)_{1,8}$

В результате проведенных исследований показано, что есть пределы концентраций ионов-заместителей в структуре ГА, при которых замещенный ГА не проявляет цитотоксических свойств. Исследования *in vitro* путем стандартного МТТ теста показали, что при ведении ионов цинка, железа в структуру ГА совместно с ионами кремния цитотоксический эффект не проявляется до $x = 0{,}2$, при введении ионов лантана — до $x = 1$. Установлено, что одновременное введение ионов цинка, серебра и силикатной группы в структуру ГА приводит проявлению антибактериальной активности материала против *E. coli* и *L. monocytogenes*.

В экспериментах *in vivo* на крысах исследовалось влияние покрытия на титановых имплантатах из серебро-цинк-силикат-замещенного ГА. Установлено, что присутствие ионов серебра, цинка и кремния оказывает положительное влияние на процессы остеоиндукции, вызванные ГА. Остеогенез в случае использования замещенного ГА более полный и характеризуется выраженной минерализацией костных клеток, что не наблюдалось при покрытии имплантатов незамещенным ГА. Также вводимые ионы не оказывают токсического влияния на костную ткань [2]. Исследование влияния гранул из цинк-магний-силикат-замещенного ГА на процесс заживления костного дефекта на крысах показал, что данный состав стимулирует рост новой костной ткани [3].

На основании проделанной работы можно сделать вывод, что ионные замещения в структуре ГА благоприятно влияют на биологические свойства материала и являются перспективным направлением в области восстановительной костной хирургии.

Литература

1. Šupová M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review // Ceramics International. 2015. Vol. 41. P. 9203–9231.

2. Khvostov M.V., Bulina N.V., Zhukova N.A. et al. A study on biological properties of titanium implants coated with multisubstituted hydroxyapatite // Ceramics International. 2022. Vol. 48. P. 34780–34792.

3. Bulina N.V., Khvostov M.V., Borodulina I.A. et al. Substituted hydroxyapatite and β-tricalcium phosphate as osteogenesis enhancers // Ceramics International. 2024. Vol. 50. P. 33258–33269.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-333

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПИРАЗОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

EVALUATION OF THE ANTITUMOR EFFECT OF PYRAZOLE DRUGS

М. А. Макеев, Р. И. Халимов, Е. В. Паравина

Алтайский государственный университет, Барнаул

M. A. Makeev, R. I. Khalimov, E. V. Pararvina

Altai State University, Barnaul

✉ khalimov@mail.asu.ru

Аннотация

Гетерокомплексы переходных металлов являются потенциальными противоопухолевыми агентами. В работе изучается цитотоксичность ряда пиразольных комплексов меди и кобальта в отношении раковых клеток лимфомы. Было показано снижение жизнеспособности клеток под действием исследуемых соединений.

Abstract

Transition metal heterocomplexes are the potential anti-tumor drugs. In this study, the cytotoxicity of several pyrazole complexes with copper and cobalt against lymphoma cells has been evaluated. It was shown that cell viability lowered under the influence of test compounds.

Онкологические заболевания являются одной из ведущих причин смертности в развитых странах, включая Российскую Федерацию [1]. Одной из групп потенциальных противоопухолевых препаратов являются азотсодержащие несимметричные комплексные соединения переходных металлов, таких как медь, кобальт, железо. Исследования демонстрируют цитотоксичность данных соединений в отношении раковых клеток. Известны цитотоксические свойства новых триазольных комплексов меди, а также комплексом кобальта с тиосемикарбазонами. Результаты исследований показывают высокую эффективность подобных соединений в борьбе с раковыми клетками [2].

Целью данной работы являлось изучение цитотоксичности ряда пиразольных комплексов с переходными металлами в отношении раковых клеток лимфомы (JURKAT).

Клетки лимфомы культивировали в среде RPMI 10 % сыворотки, 1 % антибиотика гентамицина при 37 °C и 5 % CO_2. Эксперимент проводился в планшете на 96 лунок с необработанной поверхностью, посевная концентрация клеток составляла $0{,}01 \times 10^6$ кл/мл. Для исследования клетки были разделены на несколько групп (в скобках указаны вещества, вносимые в лунки с клетками соответствующей группы): группа 1 (физиологический раствор, контроль), группа 2 (1-(бензимидазол-1-ил)-2-(3,5-диметилпиразол-1-ил)этандихлоромедь), группа 3 (1-(бензимидазол-1-ил)-2-(3,5-диметилпиразол-1-ил)этандинитратомедь), группа 4 (1-(бензимидазол-1-ил)-2-(3,5-диметилпиразол-1-ил)этандихлоркобальт), группа 5 (1-(бензимидазол-1-ил)-2-(3,5-диметилпиразол-1-ил)этан-(2,2-бипиридин)-дихлоромедь), группа 6 (1-(бензимидазол-1-ил)-2-(3,5-диметилпиразол-1-ил)этан-(2,2-бипиридин)-динитратомедь), группа 7 (1-(бензимидазол-1-ил)-2-(3,5-диметилпиразол-1-ил) этан(2,2-бипиридин)дихлоркобальт). Эксперимент проводился в двух повторениях. В первом повторении концентрация исследуемых веществ составляла 0,006 моль/л, а во втором — 0,0015 моль/л. Эффективные концентрации были установлены в предварительном эксперименте с использованием неорганических солей меди и кобальта. Клетки культивировались в планшете с исследуемыми веществами в течение 48 часов, после чего проводился подсчет в камере Горяева.

В результате подсчета клеток, получавших исследуемые вещества в концентрации 0,006 моль/л, установлено следующее распределение концентраций клеток по группам: группа 1 — $4{,}92 \times 10^6$ кл/мл, группа 2 — $0{,}49 \times 10^6$ кл/мл, группа 3 — $0{,}53 \times 10^6$ кл/мл, группа 4 — $0{,}46 \times 10^6$ кл/мл, группа 5 — $0{,}71 \times 10^6$ кл/мл, группа 6 — $0{,}67 \times 10^6$ кл/мл, группа 7 — $0{,}54 \times 10^6$ кл/мл. В результате подсчета клеток, получавших исследуемые вещества в концентрации 0,0015 моль/л, установлено следующее распределение концентраций клеток по группам: группа 1 — $4{,}92 \times 10^6$ кл/мл, группа 2 — $0{,}63 \times 10^6$ кл/мл, группа 3 — $0{,}71 \times 10^6$ кл/мл, группа 4 — $0{,}73 \times 10^6$ кл/мл, группа 5 — $0{,}64 \times 10^6$ кл/мл, группа 6 — $0{,}67 \times 10^6$ кл/мл, группа 7 — $0{,}70 \times 10^6$ кл/мл.

© М. А. Макеев, Р. И. Халимов, Е. В. Паравина, 2024

Таким образом, исследуемые пиразольные гетерокомплексы переходных металлов проявляют выраженную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток, что может служить основанием для проведения дальнейших исследований по разработке онкологических медицинских препаратов.

Литература

1. Шведский М. С., Бахова Л. А. Синтетические биомаркеры в современной онкологии // Академический журнал Западной Сибири. 2021. Т. 17(3). С. 29–30.

2. Кульбакина И. И., Чернова Н. П., Ильина Е. Г. Синтез азотсодержащих несимметричных комплексных соединений меди и кобальта // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности: материалы XVI Всерос. науч.-практ. конф. студ., аспирантов и молодых ученых с междунар. участием, Бийск 24–26 мая 2023 г. Барнаул: Изд. АлтГТУ им. И. И. Ползунова, 2023. С. 71–73.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-334

ИНГИБИТОРЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ В ПРОФИЛАКТИКЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА: ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ *IN VITRO*

NEURAMINIDASE INHIBITORS IN THE PREVENTION OF ATHEROSCLEROSIS: *IN VITRO* TOXICITY ASSESSMENT

Е. А. Марасаева

Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва

E. A. Marasaeva

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow

✉ lisamarasaeva@gmail.com

Аннотация

Участие фермента нейраминидазы было отмечено в ряде заболеваний, включая атеросклероз, что характеризуется удалением остатков сиаловой кислоты с поверхности гликокаликса и развитием патологических изменений в клетках. Модулирование активности нейраминидазы с помощью ее ингибиторов может способствовать предотвращению развития атеросклеротических проявлений на ранних стадиях заболевания.

Abstract

The participation of the enzyme neuraminidase has been noted in a number of diseases, including atherosclerosis, which is characterized by the removal of sialic acid residues from the surface of the glycocalyx and pathological changes in cells. Modulating neuraminidase activity using inhibitors can prevent the development of atherosclerosis at its early stages.

Атеросклероз относится к хроническим заболеваниям сердечно-сосудистой патологии и ведущим причинам смертности во всем мире. К начальному фактору развития заболевания относится дисфункция эндотелия сосудов [1]. В таких условиях циркулирующие липопротеиды низкой плотности (ЛНП) проникают в поврежденный эндотелий и накапливаются в субэндотелиальных слоях, где ЛНП склонны к различным атерогенным модификациям, включая окисление, гликирование, ферментативную модификацию [1]. Однако подобные модификации относятся к промежуточным или прогрессирующим атеросклеротическим поражениям, в то время как изучение предварительных стадий атерогенеза способно выявить пусковые механизмы патологического процесса до их клинического проявления. К таким начальным этапам следует отнести модификацию ЛНП ферментом нейраминидазой в плазме крови пациентов, больных атеросклерозом [2]. Десиалирование заключается в отщеплении ферментом концевой сиаловой кислоты, которая выполняет роль переключателя для контроля функции клеточной поверхности и растворимых гликопротеинов. Такие модифицированные липопротеиды легче проникают внутрь кровеносного сосуда ввиду потери отрицательного заряда и экранирующей функции сиаловой кислоты, а также приобретают способность к агрегации [2]. Считается, что контроль фермента нейраминидазы с помощью ее ингибирования способен предотвратить начальные процессы развития атеросклероза [3].

В данном исследовании изучалась цитотоксичность ингибиторов различного происхождения *in vitro* на клеточной модели моноцитарно-макрофагальной линии клеток THP-1. Для этого были выбраны 10 синтезированных веществ натурального и синтетического происхождения на основе анализа их активности — значений концентраций полумаксимального ингибирования в диапазоне 2–73 μM.

Для изучения цитотоксического эффекта ингибиторов нейраминидазы на клетки THP-1 был применен MTT-тест с веществами в различной концентрации (0,3–20 мкМ), который позволяет оценить метаболическую активность клеток. Выживаемость клеток оценивалась по изменению оптической плотности в процентах относительно контроля без добавления веществ. На основании полученных данных рассчитывалось значение концентраций, при которых жизнеспособность клеток снижалась на 50 % по сравнению с контролем (IC50) (рис. 1). Результат представлен как среднее в эксперименте из трех повторностей с учетом стандартных отклонений (SD).

Анализ результатов MTT-анализа показал, что наиболее безопасными для клеток ингибиторами являются *Epigallocathechin* — ингибитор растительного происхождения и *HIA 381* — ингибитор синтетического происхождения, для которых не удалось установить значения IC_{50} ввиду их крайне низкой токсичности. Самыми

© Е. А. Марасаева, 2024

токсичными оказались ингибиторы синтетический: *№ 26* (IC_{50} 1,4 ± 0,2 μM) и растительный: *Kaempferol-7-O-neohesperidoside* (IC_{50} 1,2 ± 0,1 μM). Оптимальным диапазоном концентраций, при котором ингибиторы обладают наименьшим цитотоксическим действием, является 1–2,5 мкМ.

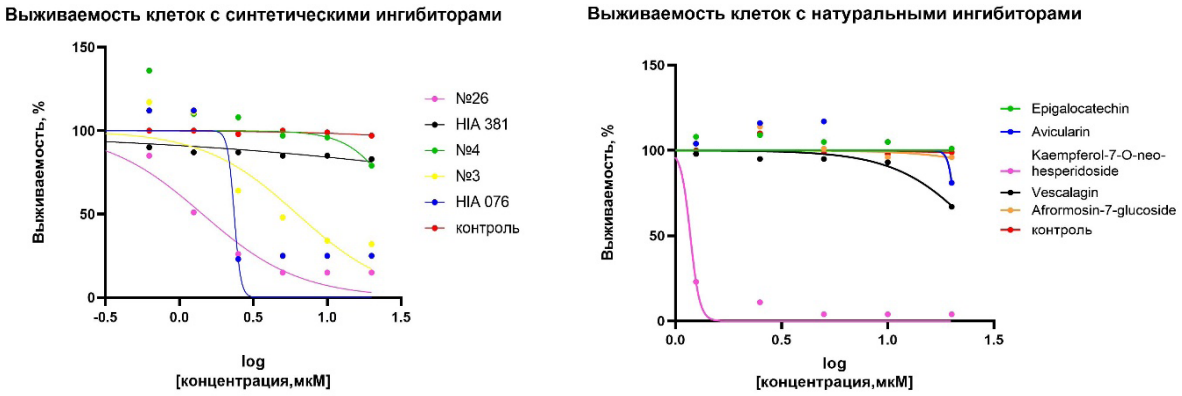


Рис. 1. Оценка жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста

Для изучения зависимости выживаемости клеток с ингибиторами от времени был использован метод оценки с трипановым синим. Цитотоксический эффект изучался в трех временных интервалах — после 2, 6 или 24 часов инкубации (рис. 2).

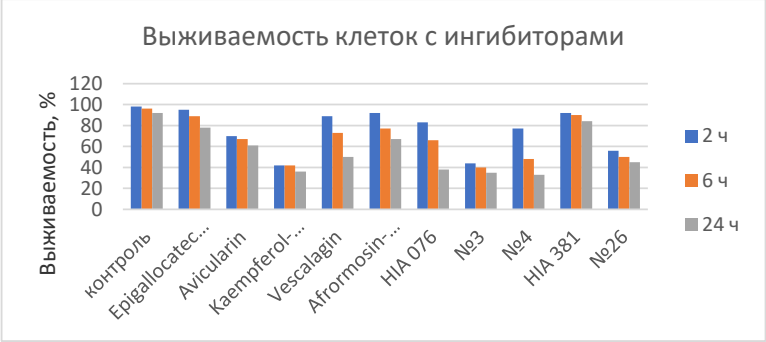


Рис. 2. Зависимость выживаемости клеток
с ингибиторами нейраминидазы от времени

В течение первых 4 часов наблюдений во всех изучаемых пробах доля живых клеток превышала 50 % от первоначального значения. При последующих измерениях было обнаружено, что в части исследуемых образцов (ингибиторы *№ 4, 076, Vescalagin*) стремительно снижалось тотальное количество клеток в суспензии. Однако общая зависимость выживаемости клеток с ингибитором от времени оказалась статистически незначимой.

Таким образом, найдены эффективные ингибиторы нейраминидазы — *Epigallocatechin* и *HIA 381*, которые могут быть использованы для изучения возможности предотвращения начальных этапов развития атеросклеротических изменений, накопления ЛНП в эндотелии сосудов.

Литература

1. Shifa Jebari-Benslaiman et al. Pathophysiology of Atherosclerosis // Int. J. Mol. Sci., 2022.
2. Glanz V. et al. Thirty-Five-Year History of Desialylated Lipoproteins Discovered by Vladimir Tertov // Biomedicines, 2022.
3. Sobenin I.A. et al. Prospects for the Use of Sialidase Inhibitors in Anti-atherosclerotic Therapy // Curr. Med. Chem., 2021.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-335

МЕХАНИЗМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ ГОЛОТУРИИ *CUCUMARIA DJAKONOVI* В ОТНОШЕНИИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА [*]

MECHANISM OF ANTICANCER ACTION OF TRITERPENE GLYCOSIDES FROM THE SEA CUCUMBER *CUCUMARIA DJAKONOVI* AGAINST HUMAN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

Е. С. Менчинская, Е. А. Чингизова, Е. А. Пислягин, А. С. Сильченко

Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток

E. S. Menchinskaya, E. A. Chingizova, E. A. Pislyagin, A. S. Silchenko

Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS, Vladivostok

✉ ekaterinamenchinskaya@gmail.com

Аннотация

Рак молочной железы считается самой распространенной формой онкологических заболеваний среди женщин во всем мире. Самый неблагоприятный для больных трижды негативный рак молочной железы (линия MDA-MB-231) наиболее чувствителен к химиотерапии. Целью данного исследования была идентификация путей, запускаемых и регулируемых гликозидами, кукумариозидом A_0-1 и дьяконовиозидом А, выделенными из голотурии *Cucumaria djakonovi* в клетках MDA-MB-231.

Abstract

Breast cancer is considered to be the most common form of cancer among women worldwide. Triple-negative breast cancer is the most unfavorable for patients, but also the most sensitive to chemotherapy. The aim of this study was to identify the pathways triggered and regulated by the glycosides, cucumarioside A_0-1 and djakonovioside A, isolated from the sea cucumber *Cucumaria djakonovi* in MDA-MB-231 cells.

Известно, что трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) не поддается гормональному лечению из-за низкой экспрессии или полного отсутствия рецепторов к эстрогену (ER), прогестерону (PR) и эпидермальному фактору роста человека (HER2). Он обладает высоким уровнем инвазии и метастазирования в головной мозг, легкие и печень. Основным методом лечения ТНРМЖ остается химиотерапия, поэтому поиск соединений, способных заблокировать рост и прогрессирование данного вида опухолей является актуальным.

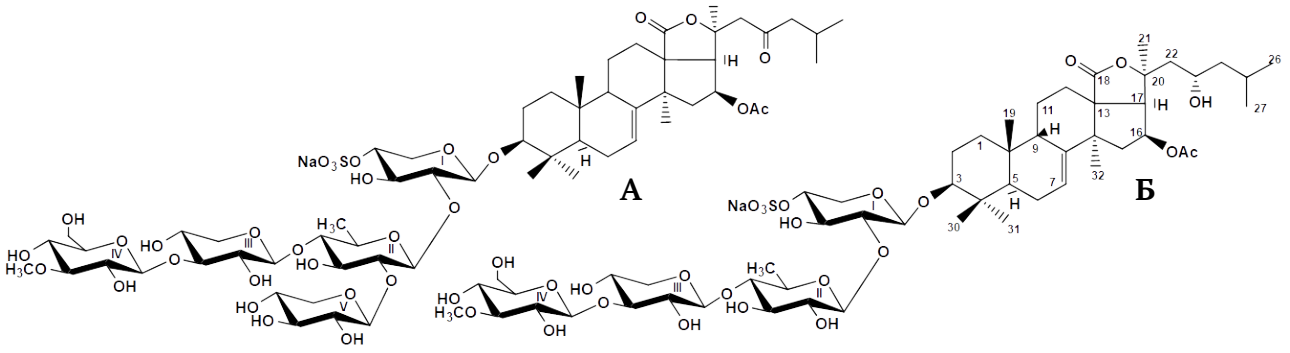
На первом этапе исследования была изучена цитотоксическая и антипролиферативная активность десяти тритерпеновых гликозидов, выделенных из голотурии *Cucumaria djakonovi*, в отношении трех линий рака молочной железы: MCF-7, T-47D и в том числе ТНРМЖ (MDA-MB-231).

Наиболее чувствительной клеточной линией оказалась MDA-MB-231, а самыми активными соединениями из серии — кукумариозид A_0-1 и дьяконовиозид А (см. рисунок), проявлявшие выраженную цитотоксическую и антипролиферативную активность в микромолярном диапазоне концентраций, с $EC_{50} \leqslant 10$ мкМ. Поэтому данные вещества были отобраны для установления механизмов противоопухолевого действия в отношении клеток ТНРМЖ.

Так, кукумариозид A_0-1 показал почти трехкратное увеличение активности с EC_{50} = 6,04 мкМ за 24 ч до EC_{50} = 2,19 мкМ за 72 ч инкубирования с клетками. Оба соединения достоверно блокировали формирование и рост колоний опухолевых клеток в концентрациях ниже EC_{50}. Кукумариозид A_0-1 в концентрации 0,5 мкМ ингибировал колониеобразование на 44 % по сравнению с контролем. Дьяконовиозид А тормозил рост колоний на 41 % от контроля при максимальной исследуемой концентрации 2 мкМ. Оба гликозида во всем исследуемом диапазоне концентраций (0,05 × 0,5 мкМ для кукумариозида A_0-1 и 0,25 × 2 мкМ для дьяконовиозида А) ингибировали миграцию опухолевых клеток [1]. С помощью проточной цитометрии было изучено влияние гликозидов на блокирование клеточного цикла и индукцию апоптоза в клетках ТНРМЖ. Установлено, что кукумариозид A_0-1 в концентрациях 0,5 и 1 мкМ блокировал клеточный цикл в фазе G_2/M. В то время как дьяконовиозид А останавливал клеточный цикл в фазе S. Стимуляция клеток гликозидами в течение 24 ч достоверно увеличивала процент клеток в стадии раннего апоптоза Annexin V-FITC (+)/PI (–). Для установления участия каспаз-3/7 в индукции

[*] Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 23-13-00078).

© Е. С. Менчинская, Е. А. Чингизова, Е. А. Пислягин, А. С. Сильченко, 2024



Химические структуры кукумариозида A_0-1 (*А*) и дьяконовиозида А (*Б*), выделенных голотурии *Cucumaria djakonovi*

апоптоза под действием гликозидов был использован набор Muse Caspase-3/7 Kit и клеточный анализатор Muse. Доля клеток с активированными каспазами-3/7 составила 39 и 18 % при обработке кукумариозидом A_0-1 (1 мкМ) и дьяконовиозидом А (2 мкМ) в течение 24 ч, соответственно, тогда как количество апоптотических клеток в контроле составило 2,5 %. Анализ влияния тритерпеновых гликозидов на уровень АФК и мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\psi m$) изучался с помощью флуоресцентной спектроскопии. Показано, что оба гликозида стимулируют выработку АФК в клетках MDA-MB-231 уже через 6 ч инкубирования, снижая мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\psi m$). Эффект действия гликозидов зависел от дозы и времени. Деполяризация митохондриальной мембраны в результате действия кукумариозида A_0-1 и дьяконовиозида А приводила к повышению уровня Apaf-1 и цитохрома С, что, в свою очередь, стимулировало расщепление каспазы-9 и каспазы-3, что подтверждалось вестерн-блот анализом. Гликозиды оказывали влияние на уровень экспрессии белков Bax и Bcl-2, связанных с митохондриально-опосредованным путем апоптоза в клетках MDA-MB-231. Полученные результаты указывают на то, что кукумариозид A_0-1 и дьяконовиозид А запускают внутренний путь апоптоза в клетках тройного негативного рака молочной железы.

Литература

1. Silchenko A. S., Kalinovsky A. I., Avilov S. A., Popov R. S., Dmitrenok P. S., Chingizova E. A., Menchinskaya E. S., Panina E. G., Stepanov V. G., Kalinin V. I., Stonik V. A. Djakonoviosides A, A1, A2, B1–B4 — triterpene monosulfated tetra- and pentaosides from the Sea Cucumber *Cucumaria djakonovi*: the first finding of a hemiketal fragment in the aglycones; activity against human breast cancer cell // International Journal of Molecular Science. 2023. 24 (13). 11128.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-336

ТЕСТИРОВАНИЕ ЭКСТРАКТА *BETONICA OFFICINALIS* L. В ОТНОШЕНИИ ИНТЕНСИВНОСТИ ВАКУОЛИЗАЦИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

TESTING OF *BETONICA OFFICINALIS* L. EXTRACT IN RELATION TO THE INTENSITY OF VACUOLIZATION AND DNA DAMAGE IN THE BRAIN OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

А. Д. Мокроусов, О. Н. Антосюк, А. Н. Ляхова

Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б. Н. Ельцина, Екатеринбург

A. D. Mokrousov, O. N. Antosyuk, A. N. Lyahova

Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin, Yekaterinburg

✉ antosuk-olga@mail.ru

Аннотация

Betonica officinalis L. — перспективный представитель семейства Lamiaceae в отношении исследования нейротоксикологии и генетической активности. Тестировали экстракт в 2 и 5% концентрации относительно общего объема питательного субстрата для культивирования модельного объекта *Drosophila melanogaster*. При использовании 5% экстракта *B. officinalis* зарегистрировали повреждения ДНК и повышение уровня вакуолизации мозга у *D. melanogaster*.

Abstract

Betonica officinalis L. is a promising representative of the Lamiaceae family in relation to the study of neurotoxicology and genetic activity. The extract was tested at 2 and 5% concentrations relative to the total volume of the nutrient substrate for cultivation of the model object *Drosophila melanogaster*. The 5% extract of *B. officinalis*, DNA damage and an increase in the level of brain vacuolization in *D. melanogaster* were recorded.

Тестирование свойств лекарственного растительного сырья (ЛРС) является неотъемлемой частью доклинических исследований. Представители семейства Lamiaceae демонстрируют широкий спектр эффектов, таких как бактерицидный, противовирусный, противогрибковый [1]. *Betonica officinalis* L., несмотря на описанные свойства, остается малоизученным видом.

Ранее описаны противовирусные свойства *B. officinalis* против штамма гриппа, а также показана генотоксичность на уровне хромосом [2]. В отношении нервной системы описание действия данного вида ЛРС отсутствует. В связи с чем целью исследования определили оценку вакуолизации и повреждения ДНК в головном мозге *Drosophila melanogaster* при культивировании на среде с внесением экстракта *B. officinalis* в 2 и 5% относительно общего объема питательного субстрата.

В работе использовали лабораторную линию дикого типа Oregon-R *Drosophila melanogaster*. Особей культивировали в стандартных лабораторных условиях (24 °С и влажность не менее 60 %) на следующих экспериментальных средах: с внесением экстракта 2, 5%, экстрагента 2, 5% (70% этанол), контроль без внесений.

Для оценки повреждения ДНК личинок культивировали на экспериментальных питательных средах не менее 24 часов, после чего извлекали мозг, гомогенизировали в фосфатном буфере и заключали в агарозном геле на предметном стекле. После лизиса и электрофореза окрашивали бромистым этидием и микроскопировали. При анализе производили ранжирование по степени поврежденности ДНК от 0 до 4.

Подготовку проб для изготовления гистологических препаратов мозга *D. melanogaster* осуществляли путем фиксации особей, выращенных на экспериментальных питательных средах, в 4% PFA (параформальдегид) и заливки парафиновых блоков для дальнейшего изготовления срезов на микротоме.

При проведении анализа гистологических препаратов оценивали показатели площади мозга, площади и количество вакуолей на препаратах и рассчитали процент, который занимают вакуоли от общей площади мозга.

В ходе дискриминантного анализа выявили, что при сравнении экспериментальных групп, выращенных на питательном субстрате с добавлением этилового спирта 5%, экстракта *B. officinalis* 5%, и контрольной группы наблюдается статистически значимое отличие особей, выращенных на 5% экстракте, в отношении показателя количества вакуолей (рис. 1).

© А. Д. Мокроусов, О. Н. Антосюк, А. Н. Ляхова, 2024

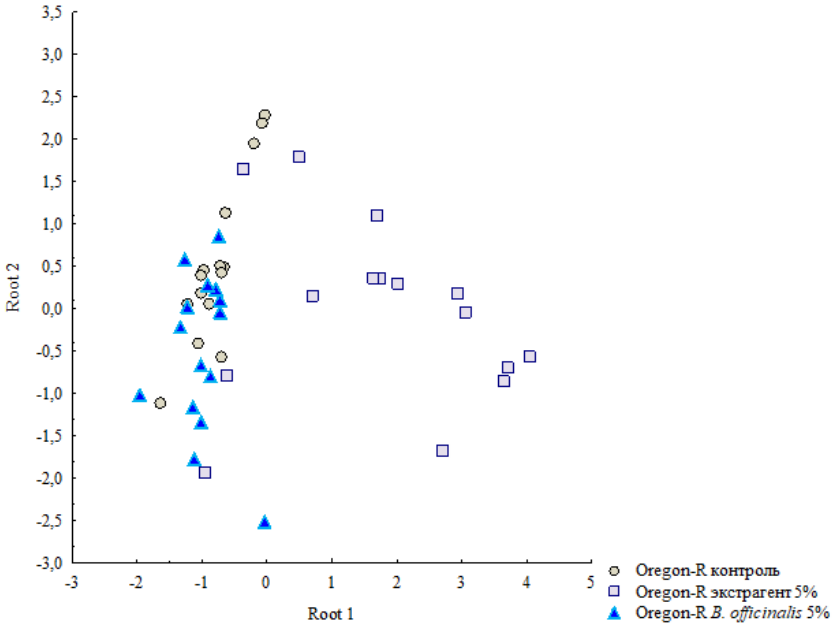


Рис. 1. Дискриминантный анализ канонических переменных параметров мозга *D. melanogaster*

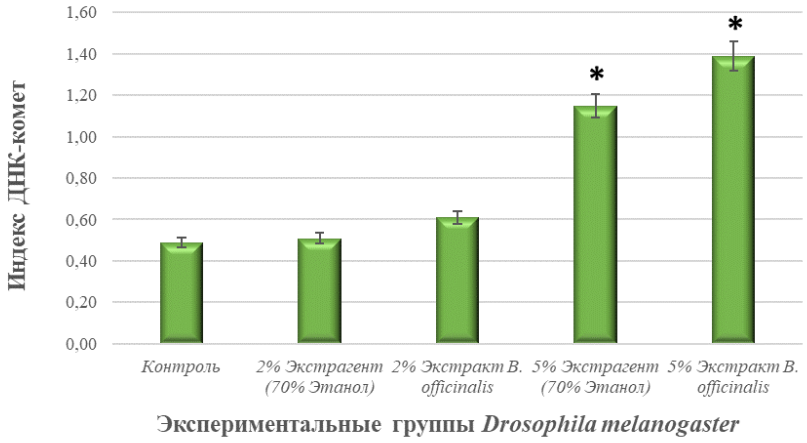


Рис. 2. ИДК мозга различных экспериментальных групп *D. melanogaster*

При оценке повреждения ДНК в мозге личинок, культивируемых на экспериментальных питательных средах, обнаружили, что добавление в субстрат 5% экстракта или экстрагента вызывает повышение показателя индекса ДНК-комет (ИДК) (см. рис. 2).

При использовании 5% экстракта *B. officinalis* зарегистрировали повреждения ДНК и повышение уровня вакуолизации мозга у *D. melanogaster*, тогда как 2% концентрация не демонстрирует подобного эффекта.

Литература

1. Проценко М. А., Мазуркова Н. А., Филиппова Е. И., Кукушкина Т. А., Лобанова И. Е., Пшеничкина Ю. А., Высочина Г. И. Противогриппозная активность экстрактов растений семейства Lamiaceae // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 181–190.

2. Slapšytė G., Dedonytė V., Adomėnienė A., Rimantas Lazutka J., Kazlauskaitė J., Ragažinskienė O., Venskutonis P. R. Genotoxic properties of Betonica officinalis, Gratiola officinalis, Vincetoxicum luteum and Vincetoxicum hirundinaria extracts // Food Chem. Toxicol. 2019. Vol. 134. 110815.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-337

РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ ЭФФЕКТ РЕКОМБИНАНТНОГО ГМ-КСФ И ЕГО ХИМЕРНОЙ ФОРМЫ НА МОДЕЛИ ОЖОГОВЫХ РАН КРЫСЫ *

WOUND HEALING EFFECT OF RECOMBINANT GM-CSF AND ITS CHIMERIC FORM IN A RAT BURN WOUND MODEL

К. И. Мосалев[1], А. А. Абышев[1,2], М. В. Котова[1], М. А. Карпов[1,2], С. М. Мирошниченко[1], М. Б. Пыхтина[1]

[1] *Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Новосибирский государственный медицинский университет Минздрава России*

K. I. Mosalev[1], A. A. Abyshev[1,2], M. V. Kotova[1], M. A. Karpov[1,2], S. M. Miroshnichenko[1], M. B. Pykhtina[1]

[1] *Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Novosibirsk State Medical University*

✉ mosalevkir@mail.ru

Аннотация

Рекомбинантные цитокины активно исследуются в качестве возможных фармакологических агентов для заживления различных ран. В данной работе изучено ранозаживляющее действие рекомбинантного ГМ-КСФ человека (рГМ-КСФ), а также его химерной формы с аполипопротеином A-I (рГМ-КСФ-АпоАI) на модели ожога III степени у крыс. Показано, что оба цитокина способствуют заживлению раны, однако химерная форма эффективнее снижает воспаление и стимулирует неоангиогенез зрелых сосудов.

Abstract

Recombinant cytokines are being actively investigated as possible pharmacological agents for the healing of various wounds. In this work, we studied the wound healing effect of recombinant human GM-CSF (rGM-CSF) and its chimeric form with apolipoprotein A-I (rGM-CSF-ApoAI) on the model of III degree burns in rats. It was shown that both cytokines promote wound healing, but the chimeric form more effectively reduces inflammation and stimulates neoangiogenesis of mature vessels.

Термические повреждения являются достаточно распространенной причиной травматизма. Согласно статистическим данным ВОЗ, ожоговые раны ежегодно приводят к гибели около 180 000 человек. При этом основными причинами смерти после ожога являются сопутствующая инфекция и шок, обусловленные нарушением целостности эпителиального барьера и повышением проницаемости сосудов с потерей жидкости [1].

Показано, что применение ростовых факторов (в т. ч. ГМ-КСФ) сокращает время заживления ожоговых ран и при этом не вызывает значимых побочных эффектов [2].

В настоящей работе исследовали ранозаживляющие свойства рГМ-КСФ и рГМ-КСФ-АпоАI, полученные биосинтезом в дрожжах *P. Pastoris*, на модели ожоговой раны III степени у крыс Wistar. Ожог III степени вызывали на выбритом участке спины площадью 1 см^2 аппликацией нагретым в кипятке металлическим грузом. Препараты белков (4 мкг/мл рГМ-КСФ и 11,2 мкг/мл рГМ-КСФ-АпоАI) и контрольный буфер равномерно наносили аппликатором на область поражения с захватом здоровых тканей, начиная с 1 суток эксперимента. Верификацию гистологических изменений проводили на 3-и, 16-е и 25-е сутки. Кроме этого, осуществляли забор биоптатов кожи для измерения экспрессии генов цитокинов — маркеров раневого процесса.

К 16-м суткам после ожога в контрольных образцах и в присутствии рГМ-КСФ наблюдался обширный инфильтрированный очаг некроза, достигающий глубоких слоев дермы, в то время как в образцах кожи, обработанных рГМ-КСФ-АпоАI, он располагался поверхностно, и инфильтрация лейкоцитами была минимальна. В присутствии рГМ-КСФ поддерживалось повышенное содержание нейтрофилов, в то время как в контроле и в присутствии химерной формы происходило их резкое падение. В то же время химерная форма белка способствовала увеличению относительного содержания лимфоцитов (в 4,2 раза на 3 сутки и в 1,3 раза на 16 сутки, $p = 0{,}0006$) по сравнению с контролем. Воспалительный статус в присутствии рГМ-КСФ, возможно, объясняется чужеродностью белка, который имеет не более 56 % гомологии с цитокином грызунов, в то время как АпоАI относится к высококонсервативным белкам. Рекомбинантные цитокины к 16–25 суткам способствовали

* Работа выполнена по теме государственного задания № 1022072600029-5-1.6.2;1.6.8 в рамках бюджетного проекта № 122032200236-1 с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

© К. И. Мосалев, А. А. Абышев, М. В. Котова, М. А. Карпов, С. М. Мирошниченко, М. Б. Пыхтина, 2024

формированию мелких и более крупных сосудов, выстланных эндотелием. Применение рГМ-КСФ приводило к увеличению объемной плотности сосудов в ожоговой ране к 25-м суткам (Vv контроль — 0,63 против Vv рГМ-КСФ — 2,5), а обработка раны рГМ-КСФ-АпоАI повышала соотношение м-РНК генов *Angpt1/Angpt2* в коже по сравнению с контролем ($p = 0,049$) на 16-е сутки. Данное наблюдение в совокупности с присутствием зрелых сосудов на 16-е и 25-е сутки в ранах, обработанных рГМ-КСФ-АпоАI, может свидетельствовать об ускорении процесса неоангиогенеза под влиянием химерного белка. Толщина эпидермиса у особей, обработанных рГМ-КСФ-АпоАI, к 25 суткам эксперимента была в 1,5 раза больше, чем у контрольных особей ($p = 0,00$), и контракция раны происходила быстрее.

Таким образом, рекомбинантные цитокины стимулируют заживление ожоговой раны, однако химерная форма рГМ-КСФ эффективнее снижает воспалительную инфильтрацию и способствует формированию зрелых кровеносных сосудов.

Литература

1. Tiwari V. K. Burn wound: How it differs from other wounds? // Indian J. Plast. Surg. 2012. Vol. 45(2). P. 364–373.

2. Zhang Yi, Wang Tao, He Jinguang, Dong Jiasheng. Growth factor therapy in patients with partial-thickness burns: a systematic review and meta-analysis // International Wound Journal. 2014. n/a–n/a.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-338

ГЕН-АКТИВИРОВАННЫЕ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ 3D-ПЕЧАТИ, СОДЕРЖАЩИЕ АДЕНОВИРУСНЫЕ КОНСТРУКЦИИ С ГЕНОМ *BMP2* *

3D-PINTED GENE-ACTIVATED OSTEOPLASTIC SCAFFOLDS IMPREGNATED WITH ADENOVIRAL CONSTRUCTS WITH THE *BMP2* GENE

И. А. Недорубова[1,2], В. О. Черномырдина[1,2], А. Ю. Меглей[1,2], В. П. Басина[1], А. В. Миронов[2,3], Е. М. Трифанова[2,3], А. В. Васильев[1,2], В. К. Попов[3], Д. В. Гольдштейн[1], А. А. Кулаков[2], Т. Б. Бухарова[1,2]

[1]Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва
[2]Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава России, Москва
[3]Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт», Москва

I. A. Nedorubova[1,2], V. O. Chernomyrdina[1,2], A. Yu. Meglei[1,2], V. P. Basina[1], A. V. Mironov[2,3], E. M. Trifanova[2,3], A. V. Vasilyev[1,2], V. K. Popov[3], D. V. Goldshtein[1], A. A. Kulakov[2], T. B. Bukharova[1,2]

[1]Research Centre for Medical Genetics, Moscow
[2]Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow
[3]FSRC "Crystallography and photonics", NRC "Kurchatov Institute", Moscow

✉ nedorubova.ia@gmail.com

Аннотация

Методы 3D-печати позволяют формировать матриксы в соответствии с формой замещаемого костного дефекта. Добавление генетических конструкций с генами остеоиндуктивных белков обеспечивает экспрессию и терапевтическое действие этих факторов в области регенерации. Методом антисольвентной 3D-печати получены PLGA матриксы с аденовирусными частицами, несущими ген *BMP2*, обладающие остеогенными свойствами *in vitro* и перспективные для клинического применения.

Abstract

3D-printing methods make it possible to fabricate matrices in accordance with the shape of the substituted bone defect. The addition of genetic constructs with genes for osteoinductive proteins provides the expression and therapeutic effect of these factors in the area of regeneration. Using anti-solvent 3D-printing, PLGA matrices with adenoviral particles carrying the *BMP2* gene were obtained, which have osteogenic properties *in vitro* and are promising for clinical use.

Потребность в эффективных остеопластических материалах для лечения пациентов с врожденными и травматическими заболеваниями костной ткани является актуальной медицинской и социальной задачей. Разработка новых ген-активированных матриксов (ГАМ), содержащих гены белков остеоиндукторов, является одним из наиболее перспективных подходов к лечению таких заболеваний. Для 3D-печати матриксов, соответствующих форме замещаемого дефекта, могут применяться полимеры на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), разрешенные к медицинскому применению. Доставка гена остеоиндуктора костного морфогенетического белка 2 (*BMP2*) может осуществляться с помощью аденовирусных конструкций — эффективного способа трансдукции клеток [1].

Цель работы: исследование свойств 3D-матриксов на основе PLGA, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2 in vitro*.

Материалы и методы

3D-матриксы на основе PLGA формировали методом антисольвентной 3D-печати [2]. Печать образцов проводили при 25 °C с использованием дозирующей насадки диаметром 330 мкм. Для получения ГАМ суспензию аденовирусных конструкций, несущих ген *BMP2* (Ad-BMP2) с концентрацией вирусной ДНК 125 нг/мкл, наносили на матриксы в течение 24 ч. Для оценки эффективности разработанных матриксов использовали в качестве модельной культуры мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, полученные из жировой

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-15-00425).

© И. А. Недорубова, В. О. Черномырдина, А. Ю. Меглей, В. П. Басина, А. В. Миронов, Е. М. Трифанова, А. В. Васильев, В. К. Попов, Д. В. Гольдштейн, А. А. Кулаков, Т. Б. Бухарова, 2024

ткани крыс (ММСК ЖТ). Цитосовместимость матриксов оценивали методом МТТ-теста и с помощью флуоресцентной микроскопии путем окрашивания живых клеток Кальцеином АМ, а мертвых — DAPI. Способность матриксов к поддержанию адгезии клеток анализировали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Способность PLGA-Ad-BMP2 матриксов трансдуцировать ММСК ЖТ оценивали по экспрессии целевого гена *BMP2* методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и по продукции BMP-2, определенной методом иммуноферментного анализа (ИФА). Индукцию остеогенной дифференцировки ММСК ЖТ после инкубации с PLGA-Ad-BMP2 анализировали по экспрессии генов методом ПЦР-РВ и продукции белков остеогенных маркеров методом ИФА.

Результаты

PLGA-Ad-BMP2 матриксы не оказывают цитотоксического действия на ММСК ЖТ. Через 1 и 7 суток относительная жизнеспособность клеток составляла 102,4 ± 2,9 % и 101,6 ± 2,3 %, соответственно, что не отличается от контроля, в котором клетки инкубировали без добавления матриксов.

С помощью флуоресцентной микроскопии обнаружено, что при инкубации ММСК ЖТ с PLGA-Ad-BMP2 большая часть клеток живые, практически не наблюдалось мертвых клеток, окрашенных DAPI. При этом к 7 суткам плотность живых ММСК ЖТ, окрашенных Кальцеином АМ, значительно увеличивалась. Методом СЭМ показано, что клетки адгезированы на поверхности PLGA-Ad-BMP2, имели характерную для ММСК морфологию. Через 7 суток инкубации ММСК ЖТ с PLGA-Ad-BMP2 уровень экспрессии целевого гена *BMP2* увеличивался в 3,5 ± 0,6 раза по сравнению с 3D-матриксами на основе PLGA без аденовирусных конструкций. Продукция белка BMP-2 в ММСК ЖТ, культивируемых в присутствии PLGA-Ad-BMP2, также возрастала в 2,3 раза по сравнению с контрольными клетками. Показано, что ГАМ обладают остеоиндуктивными свойствами. Через 14 суток после инкубации ММСК ЖТ с PLGA-Ad-BMP2 наблюдалось статистически значимое увеличение экспрессии генов щелочной фосфатазы (*Alpl*) в 2,3 ± 0,1 раза, остеокальцина (*Bglap*, Ocn) — в 1,8 ± 0,3 раз и остеопонтина (*Spp1*, Opn) — в 11,8 ± 0,3 раз по сравнению с клетками, которые культивировали в присутствии неактивированных 3D PLGA матриксов. Продукция данных белков также возрастала, и через 14 суток концентрация Alpl составляла 284 ± 4 нг/мл, Ocn 108 ± 5 пг/мл и Opn 3 ± 0 нг/мл.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают эффективность разработанных 3D-матриксов на основе PLGA, импрегнированных аденовирусными конструкциями с геном *BMP2*, *in vitro*: PLGA-Ad-BMP2 матриксы являются цитосовместимыми, обеспечивают эффективную трансдукцию ММСК ЖТ и индуцируют остеогенную дифференцировку клеток. А метод их формирования с применением антисольвентной 3D-печати является перспективным подходом к созданию персонализированных остеопластических материалов.

Литература

1. Bukharova T. B., Nedorubova I. A., Mokrousova V. O. et al. Adenovirus-based gene therapy for bone regeneration: a comparative analysis of in vivo and ex vivo BMP2 gene delivery // Cells. 2023. Vol. 12(13). P. 1762.

2. Mironov A. V., Mironova O. A., Khvorostina M. A., Popov V. K. 3D-printing of polylactic-co-glycolic acid fiber scaffolds using an antisolvent phase separation process // Polymer. 2019. 182(2). P. 121845.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-339

TDP-43 И НЕЙРОГРАНИН В ПЛАЗМЕ КРОВИ КАК БИОМАРКЕРЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬГЕЙМЕРА

TDP-43 AND NEUROGRANIN AS PLASMA BIOMARKERS OF ALZHEIMER'S DISEASE PROGRESSION

А. Г. Очнева[1,2], Я. А. Зоркина[1,2], О. В. Абрамова[1,2], В. И. Закуражная[2], В. М. Ушакова[1,2], Е. А. Зубков[1], А. Ю. Морозова[1,2], О. И. Гурина[1]

[1]*Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского, Москва*
[2]*Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н. А. Алексеева, Москва*

A. G. Ochneva[1,2], Ya. A. Zorkina[1,2], O. V. Abramova[1,2], V. I. Zakurazhnaya[2], V. M. Ushakova[1,2], E. A. Zubkov[1], A. Yu. Morozova[1,2], O. I. Gurina[1]

[1]*Serbsky Federal Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology, Moscow*
[2]*Alexeev Mental-health Clinic № 1, Moscow*

✉ aleksochneva@yandex.ru

Аннотация

Болезнь Альцгеймера (БА) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, вызывающее существенное снижение когнитивных способностей. Исследование с участием 234 пациентов с деменцией, легким когнитивным расстройством (ЛКР) и здоровым контролем в возрасте старше 65 лет показало, что биомаркеры плазмы крови, в частности, TDP-43 и нейрогранин, могут быть эффективны для оценки прогрессирования ЛКР в БА.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disease causing significant cognitive decline. A study involving 234 patients with dementia, mild cognitive impairment (MCI), and control over 65 years found that blood plasma biomarkers, specifically TDP-43 and neurogranin, could be effective in evaluating the progression of MCI to AD.

Болезнь Альцгеймера (БА) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся повреждением нейронов в областях, ответственных за память, речь и познание. Эта патология приводит к снижению когнитивных способностей, потере памяти и нарушению социальных навыков. С ростом заболеваемости наблюдается пропорциональный рост экономических и социальных последствий, что подчеркивает необходимость изучения новых диагностических подходов. Стандартные методы оценки БА включают в себя измерение амилоида-42, общего тау и фосфорилированного тау в спинномозговой жидкости [1]. Однако в связи с простотой получения (сбора) крови по сравнению с ликвором перспективным направлением является поиск именно плазменных биомаркеров.

В настоящее время активно изучаются варианты новых биомаркеров крови, например, большой интерес вызывает группа нейротрофических факторов, белков, необходимых для функционирования центральной и периферической нервной системы. Нейротрофические факторы способствуют росту и выживанию нейронов, а их дисбаланс связывают с развитием нейрокогнитивных нарушений и прогрессированием БА. Следовательно, они могут быть эффективными и ценными биомаркерами [2]. В частности, их можно использовать для прогнозирования риска развития деменции у пациентов с легким когнитивным расстройством (ЛКР) [3, 4].

В настоящее время большое внимание уделяется распознаванию риска дальнейшего прогрессирования когнитивного дефицита на стадии ЛКР. Выявление риска на ранней стадии позволит быстро скорректировать терапию и замедлить темпы когнитивного снижения [5].

Наше исследование включало пациентов с диагнозами деменции, ЛКР и здоровый контроль в возрасте старше 65 лет (n = 234). Оценка когнитивных функций проводилась с использованием краткой шкалы оценки психического статуса MMSE (Mini-Mental State Examination), а определение плазменных биомаркеров (TDP-43, нейрогранин) проводилось с помощью мультиплексного анализа. Результаты мультиплексного анализа оценивались с использованием статистических методов. По результатам анализа были показаны значимые различия в уровне TDP-43 между группами контроля и деменции ($p = 0{,}023$), а также между группами ЛКР и деменции ($p = 0{,}024$).

© А. Г. Очнева, Я. А. Зоркина, О. В. Абрамова, В. И. Закуражная, В. М. Ушакова, Е. А. Зубков, А. Ю. Морозова, О. И. Гурина, 2024

Однако не было значимых различий в уровне TDP-43 между группами контроля и ЛКР. Уровни нейрогранина показали значительные различия между группами контроля и ЛКР ($p < 001$), между группами ЛКР и деменции ($p = 0,003$) и между группами контроля и деменции ($p < 001$).

Таким образом, полученные различия в уровне биомаркеров указывают на потенциал использования нейротрофических факторов TDP-43 и нейрогранина в качестве эффективных методов оценки прогрессирования ЛКР в БА. В частности, TDP-43 и нейрогранин. Нейрогранин является более перспективным прогностическим маркером в связи с тем, что значимые изменения его уровня по сравнению с контрольной группой присутствуют уже на стадии ЛКР.

Литература

1. Olsson B., Lautner R., Andreasson U., Öhrfelt A., Portelius E., Bjerke M, Hölttä M., Rosén C., Olsson C., Strobel G., Wu E., Dakin K., Petzold M., Blennow K., & Zetterberg H. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis // The Lancet. Neurology. 2016. 15(7). P. 673–684.

2. Rajan K. B., Weuve J., Barnes L. L., McAninch E. A., Wilson R. S., & Evans D. A. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020–2060) // Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association, 2021. 17(12), 1966–1975.

3. Severini C. Neurotrophic Factors in Health and Disease // Cells, 2022. 12, 47.

4. Tondelli M., Bedin R., Chiari A., Molinari M. A., Bonifacio G., Lelli N., Trenti T., Nichelli P. Role of Cerebrospinal Fluid Biomarkers to Predict Conversion to Dementia in Patients with Mild Cognitive Impairment: A Clinical Cohort Study // Clinical chemistry and laboratory medicine/ 2015. 53(3), 453–460.

5. Mazzeo S., Santangelo R., Bernasconi M. P., Cecchetti G., Fiorino A., Pinto P., Passerini G., Falautano M., Comi G., Magnani G. Combining Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Neuropsychological Assessment: A Simple and Cost-Effective Algorithm to Predict the Progression from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease Dementia // Journal of Alzheimer's Disease, 2016. 54, 1495–1508.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-340

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛД50 СУБСТАНЦИИ ЯДА ГАДЮКИ ОБЫКНОВЕННОЙ, ВЫРАЩЕННОЙ В НЕВОЛЕ

DETERMINATION OF THE SUBSTANCE LD50 OF THE VENOM OF THE COMMON VIPER RAISED IN CAPTIVITY

Е. В. Паравина, М. А. Макеев, Р. И. Халимов

Алтайский государственный университет, Барнаул

E. V. Paravina, M. A. Makeev, R. I. Khalimov

Altai State University, Barnaul

✉ khalimov@mail.asu.ru

Аннотация

Состав ядов у гадюк, выращенных в разных условиях, может отличаться. В работе было проведено сравнение токсичности ядов гадюк из серпентария со значением токсичности, указанным в фармакопее. В результате была определена ЛД50 для яда гадюки, выращенной в неволе, и установлено, что она соответствует требованиям.

Abstract

Composition of venom from vipers raised under different conditions may vary. In present study, we compared the toxicity of serpentarium viper venom and value of toxicity from the pharmacopoeia. As a result, LD50 for captivity-raised viper has been determined, and it was ascertained that it was within the requirements.

Змеиный яд является ценным сырьем для фармацевтической науки и промышленности. Он применяется в производстве противоядных сывороток, а также в составе лекарственных препаратов в качестве противовоспалительного, болеутоляющего и местнораздражающего средства при заболеваниях периферической нервной системы [1].

В связи с растущей потребностью возрастает роль змеиных ферм и серпентариев в обеспечении фармацевтической промышленности данным сырьем. Состав яда способен меняться у особей одного вида зависимости от возраста, пола, доступности добычи, питания и многих других факторов. Поэтому сравнение состава ядов у гадюк, выращенных в серпентарии, и гадюк, пойманных в естественной среде обитания, может представлять большой интерес у фармакологических компаний [2].

Целью данной работы являлось выяснение соответствия токсичности яда гадюки обыкновенной, выращенной на змеиной ферме, значениям, указанным в фармакопее.

Материалы и методы

Высушенный образец яда гадюки обыкновенной был получен в ООО «Сибирский серпентарий». В день эксперимента навеску 0,0100 г исследуемой субстанции яда гадюки переносили в мерную колбу на 50 мл, добавляли 20 мл 0,9%-го раствора натрия хлорида, перемешивали до полного растворения и доводили 0,9%-м раствором натрия хлорида до 50 мл.

Для оценки токсичности были использованы мыши-самцы, приобретенные в ФГБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в количестве 70 голов. В день эксперимента животных взвешивали и распределяли на группы, выровненные по весу и числу животных. Средний вес животных составлял 19–21 г, число животных в группе — 8 голов. Мыши были распределены на 7 групп, которым вводили: 1 группа — 1,0 мг/кг; 2 группа — 1,5 мг/кг; 3 группа — 2,0 мг/кг; 4 группа — 2,5 мг/кг; 5 группа — 3,0 мг/кг; 6 группа — 4,0 мг/кг; 7 группа — 5,0 мг/кг. Каждому животному в соответствии с номером группы было введено расчетное количество раствора подкожно в холку. По прошествии 72 часов было подсчитано количество погибших животных в каждой группе и установлена LD50 путем пробит-анализа.

В ходе наблюдения за животными было установлено, что в группах 1–7 погибло 1, 2, 4, 4, 5, 7 и 8 животных соответственно. В соответствии с формулами, приведенными в документе ЛС 002515-310320 требованиями в программном обеспечении MS Excel были рассчитаны коэффициенты a и b, равные в настоящем исследовании

© Е. В. Паравина, М. А. Макеев, Р. И. Халимов, 2024

3,563 и 3,154 соответственно. Затем были рассчитаны десятичные логарифмы LD50 и LD50, которые составили 0,456 и 2,855 мг/кг соответственно.

Литература

1. Григорьева В. Э., Гунар О. В., Сахно Н. Г., Булгакова Г. М., Молчан Н. В. Лекарственные средства, содержащие змеиный яд: история развития, номенклатура, оценка подлинности // Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. 2018. Т. 8(2). С. 77–83.

2. Oliveira A. L., Viegas M. F., da Silva S. L., Soares A. M., Ramos M. J., Fernandes P. A. The chemistry of snake venom and its medicinal potential // Nat. Rev. Chem. 2022. Vol. 6(7). P. 451–469.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-341

КАЛЬЦИЙ КАРБОНАТНЫЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ*

CALCIUM CARBONATE MATRICES FOR CONTROLLED DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS AND THERAPEUTIC AGENTS

В. К. Попова, Е. В. Дмитриенко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

V. K. Popova, E. V. Dmitrienko

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk

✉ elenad@niboch.nsc.ru

Аннотация

В случае получения наноразмерного карбоната кальция pH-зависимый профиль деградации таких материалов делает их многообещающими кандидатами для избирательной доставки препаратов в опухолевое микроокружение. Получены стабильные суспензии наночастиц карбоната кальция и их магнитных композитов. Доказано отсутствие токсичности соединений, а также их перспективность в качестве транспортеров малых лекарственных молекул и олигонуклеотидов.

Abstract

If nanosized calcium carbonate is obtained the pH-dependent degradation profile of such compounds makes them promising candidates for selective drug delivery into the tumor microenvironment. Stable suspensions of calcium carbonate nanoparticles and their magnetic composites were obtained. The absence of toxicity of the compounds was proved, as well as their promising potential as transporters of small drug molecules and oligonucleotides.

Материалы на основе карбоната кальция нашли широкую применимость в биомедицине и пищевой промышленности, в первую очередь, благодаря биосовместимости и биоразлагаемости. Деградация матрикса частицы в зависимости от pH среды делает соединения на основе карбоната кальция перспективными для контролируемой доставки биологический активных соединений (БАС) в области организма с пониженным показателем кислотности среды, к которым можно отнести опухолевое микроокружение [1]. В связи с тем, что острая необходимость в транспортерах БАС *in vivo* обозначена для противораковых терапевтических средств, нанокомпозиты на основе частиц карбоната кальция являются многообещающими кандидатами [2]. Однако в связи с pH-лабильностью материала существуют методологические преграды получения наноразмерных частиц (до 200 нм), стабильных в виде суспензии [3].

Ранее в работе была успешно решена задача получения стабильной суспензии наночастиц карбоната кальция (CaНЧ) размером до 200 нм. Методика была адаптирована для получения гибридного материала, обладающего магнитными свойствами — композит смешанного оксида железа и карбоната кальция (Fe@CaНЧ) диаметром 135 нм [4]. Для наночастиц показаны отсутствие токсичности, а также достаточная стабильность в водных растворах и условиях, близких к физиологическим.

Полученные наноносители протестированы в качестве транспортеров двух типов наиболее распространенных классов противораковых средств — малых лекарственных молекул (на примере доксорубицина — DOX), а также терапевтических нуклеиновых кислот (на примере модельных олигонуклеотидов — ОН).

Полученные комплексы наночастиц с БАС (НЧ-БАС) характеризуются высокими емкостными характеристиками по отношению к терапевтическому агенту вплоть до 1900 мкг лекарства и 80 наномоль ОН на 1 мг наноматериала. Благодаря pH-зависимой деградации карбонатной компоненты, полученные НЧ-БАС обладают pH-опосредованным профилем высвобождения БАС (DOX/ОН) из состава нанокомпозита: вплоть до 100 % высвобождения грузовых молекул при pH 5 и до 15 % — при pH 7,4. Клеточные исследования доказали перспективность полученных соединений НЧ-БАС, а также их эффективность, превосходящую индивидуальные препараты. Кроме того, доказана возможность совместной инкапсуляции DOX и ОН с сохранением емкостных характеристик наноносителя.

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 24-24-20105) в рамках проекта, поддержанного Правительством Новосибирской области (соглашение № р-97).

© В. К. Попова, Е. В. Дмитриенко, 2024

Кроме того, в работе тщательно рассмотрен оптимальный количественный состав комплекса НЧ-БАС. Продемонстрировано отрицательное влияние на терапевтическую эффективность избыточной концентрации лекарства в составе нанокомпозита.

Таким образом, представляемая работа демонстрирует потенциал полученных наноносителей на основе композитных кальций карбонатных матриксов для направленной и/или избирательной доставки биологически активных соединений. Безусловно, многие вопросы касательно отложенной токсичности, а также Ca2+ опосредованного пути только будут рассмотрены, однако полученные знания являются перспективными для развития терапии генетических и онкологических заболеваний.

Литература

1. Lin C. et al. Recent Developments in $CaCO_3$ Nano-Drug Delivery Systems: Advancing Biomedicine in Tumor Diagnosis and Treatment // Pharmaceutics. 2024. Vol. 16(2). P. 275.

2. Yang X. et al. $CaCO_3$ nanoplatform for cancer treatment: drug delivery and combination therapy // Nanoscale. 2024. Vol. 16. P. 6876–6899.

3. Popova V. et al. Designing pH-dependent systems based on nanoscale calcium carbonate for the delivery of an antitumor drug // Nanomaterials. 2021. Vol. 11(11). P. 2794.

4. Popova V. et al. pH-responsible doxorubicin-loaded Fe_3O_4@$CaCO_3$ nanocomposites for cancer treatment // Pharmaceutics. 2023. Vol. 15(3). P. 771.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-342

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СПАРЖИ КИСТЕВИДНОЙ НА МИОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ АЭРОБНОГО ТРЕНИРОВОЧНОГО РЕЖИМА У МЫШЕЙ

EFFECTS OF AN *ASPARAGUS RACEMOSUS* EXTRACT ON THE MYOTROPIC EFFECTS OF AEROBIC EXERCISE IN MICE

В. А. Приходько, Ю. С. Алексеева, Д. А. Захлевная, В. Ц. Болотова, С. В. Оковитый

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет

V. A. Prikhodko, Yu. S. Alexeeva, D. A. Zakhlevnaya, V. Ts. Bolotova, S. V. Okovityi

Saint Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University

✉ veronika.prihodko@pharminnotech.com

Аннотация

Спаржа кистевидная *Asparagus racemosus* Willd. является перспективным источником фитоэкдистероидов, обладающих актопротекторной активностью. Настоящее исследование проведено с целью оценки потенциального влияния препарата спаржи на эффективность ранее апробированного тренировочного режима у мышей. С использованием метода игольчатой электронейромиографии подтвержден положительный миотропный эффект тренировочного режима и установлено, что курсовое введение экстракта спаржи не оказывает значимого влияния на его выраженность.

Abstract

Asparagus racemosus Willd. is a promising source of phytoecdysteroids with actoprotective properties. This study was carried out in order to evaluate the potential effect of an *A. racemosus* preparation on the effectiveness of a previously validated exercise regimen in mice. Using needle electroneuromyography, we have confirmed that the regimen itself has a beneficial effect on skeletal muscle function, and found the course administration of *A. racemosus* to provide no additional improvement of the regimen's effectiveness.

Исследование выполнено на 30 молодых белых беспородных мышах-самках массой от 20 до 25 г, полученных одной партией из ФГУП НИЦ «Курчатовский институт» — питомника лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, РФ), рандомизированных на 3 группы по 10 особей: 1) К (контроль); 2) Т (тренировочный режим); 3) ТС (тренировочный режим + экстракт спаржи). Режим состоял из 1-часовых плавательных тренировок 1 раз в день в первые 3 дня, затем — 1,5-часовых 2 раза в день 5 дней в неделю на протяжении месяца [1]. Группе ТС на протяжении всего периода исследования вводили перорально сухой экстракт спаржи (100 мг/кг) за 30 мин до начала тренировки; двум другим группам — физиологический раствор в эквиобъемных количествах.

Через 1 сутки после проведения плавательного теста проводили ЭНМГ-исследование с помощью 4-канального электронейромиографа «Нейро-МВП-4», программы NeuroMEP.NETω 3.7.3.7 и программы Нейро-МВП. NETω 3.7.3.7 (ООО «Нейрософт», РФ) в условиях анестезии хлоралгидратом (Merck, США; 400 мг/кг внутрибрюшинно). Регистрировали М-ответы икроножной мышцы на стимуляцию седалищного нерва слева и проводили тест электростимуляционного утомления (ЭСУ) в соответствии с ранее опубликованным протоколом [2]. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Prism 10.2.0 (GraphPad Software, США).

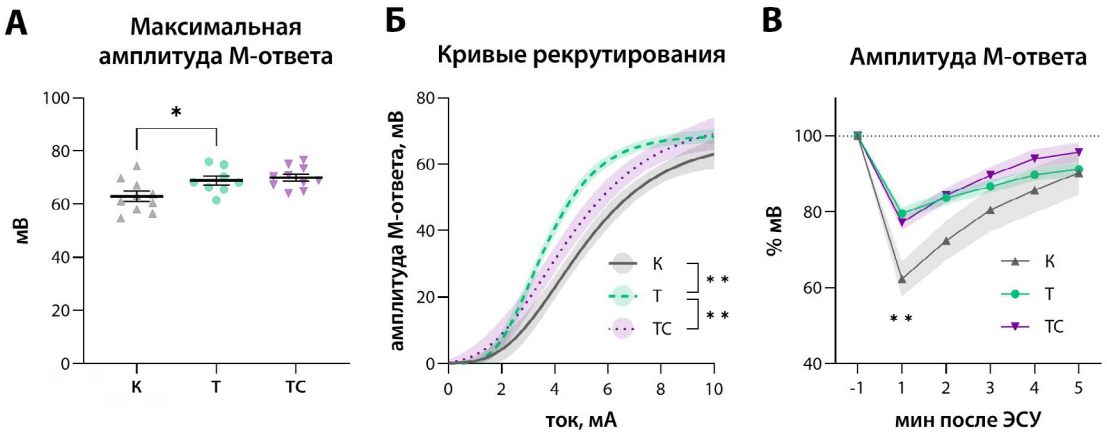
Использование тренировочного режима значимо ($p < 0,05$) увеличивало максимальную амплитуду М-ответа икроножной мышцы по сравнению с нетренированным контролем; добавление препарата спаржи не оказывало значимого влияния на эффект режима (см. рисунок, *А*).

При анализе кривых рекрутирования было определено, что кривая группы тренировочного режима значимо ($p < 0,01$ для обоих) отличается как от кривой группы контроля, так и от кривой группы, получавшей спаржу, при этом отличие носит характер не только увеличения максимальной амплитуды М-ответа, но и более быстрого и синхронного рекрутирования мышечных волокон (см. рисунок, *Б*). Результаты теста ЭСУ показали, что тренировочный режим значимо уменьшает выраженность немедленного (1 минута) утомления мышцы; добавление к режиму препарата спаржи не оказывает значимого влияния на его эффективность (см. рисунок, *В*).

Таким образом, аэробный тренировочный режим обладает прямым миотропным эффектом у мышей, что с высокой вероятностью вносит определяющий вклад в его положительное влияние на физическую работоспо-

© В. А. Приходько, Ю. С. Алексеева, Д. А. Захлевная, В. Ц. Болотова, С. В. Оковитый, 2024

собность. Добавление к режиму тренировки курсового введения экстракта спаржи (100 мг/кг) не оказывает значимого влияния на его эффективность по данным ЭНМГ-исследования.



А — максимальная амплитуда М-ответов икроножной мышцы (нормальное распределение значений; попарные сравнения путем однофакторного ANOVA с поправкой Холма — Шидака; индивидуальные значения + среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего); *Б* — кривые рекрутирования икроножной мышцы (нелинейная регрессия к кривым Гомпертца ($R^2 > 0,98$) с расчетом 95%-го доверительного интервала; попарные сравнения путем F-теста сумм квадратов); *В* — динамика амплитуды супрамаксимального М-ответа икроножной мышцы до и после ее электростимуляционного утомления (ЭСУ) (нормальное распределение значений; попарные сравнения путем однофакторного ANOVA с поправкой Холма — Шидака; среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего). К — контроль, Т — тренировочный режим, ТС — тренировочный режим + введение экстракта спаржи; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Литература

1. Радько С. В., Оковитый С. В., Куликов А. Н. и др. Модель оценки влияния фармакологических средств на динамику адаптации к физической нагрузке // Биомедицина. 2016. № 3. С. 35–42.

2. Приходько В. А., Алексеева Ю. С., Захлевная Д. А. и др. Влияние экстракта живучки туркестанской на восстановление сократимости мышц после электростимуляционного утомления у мышей // Материалы IX Междунар. науч.-метод. конф. «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств», Воронеж, 28–29 сентября 2023 г. Воронежский государственный университет, 2023. С. 619–623.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-343

РОЛЬ ОСТЕОБИОТИКОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ ОСТЕОПОРОЗА И ОБРАЗОВАНИЯ КОСТНЫХ ПОЛОСТЕЙ НА ФОНЕ ПРИЕМА АНТИБИОТИКОВ

THE ROLE OF OSTEOBIOTICS IN THE PREVENTION OF OSTEOPOROSIS AND THE FORMATION OF BONE CAVITIES WHILE TAKING ANTIBIOTICS

А. А. Пронькина[1], Д. Г. Елистратов[2], А. М. Косова[1]

[1]Пензенский государственный университет
[2]Медицинский центр «Академия здоровья», Пенза

A. A. Pronkina[1], D. G. Elistratov[2], A. M. Kosova[1]

[1]Penza State University
[2]Medical Center "Academy of Health", Penza

✉ annapronkina2308@gmail.com

Аннотация

Негативные последствия при приеме антибиотиков могут быть разнообразными и затрагивать многие органы и системы организма, в т. ч. желудочно-кишечный тракт и опорно-двигательную систему. В работе рассмотрены специфика и действие нового класса препаратов под названием «остеобиотики», проведена оценка эффективности первого отечественного средства этой категории («Остео-Вит D_3») и рассмотрена возможность его применения при антибактериальной терапии.

Abstract

The negative consequences of taking antibiotics can be diverse and affect many organs and systems of the body, including the gastrointestinal tract and the musculoskeletal system. The paper examines the specificity and effect of a new class of drugs called osteobiotics, evaluates the effectiveness of the first domestic drug of this category ("Osteo-Vit D_3") and considers the possibility of its use in antibacterial therapy.

Прием антибактериальных препаратов (АБП) может привести к метаболическим нарушениям облигатной микрофлоры и стойкому нарушению пищеварения и, как следствие, всасывания элементов, необходимых для построения скелета.

Продолжительное использование антибиотиков может привести к уменьшению минеральной плотности костной ткани, повышению хрупкости костей, образованию в них полостей, к развитию остеопороза, а также артрита или артроза [1, 2].

Современные исследования застрагивают метаболизм костной системы. Они описывают роль микробиоты кишечника в процессах остеогенеза [3], в них рассмотрена ось «кишечник — кость» и представлены новые сочетания пробиотиков и пребиотиков с минеральным матриксом кости, что может служить новым методом лечения остеопоротических нарушений костной ткани [3].

В связи с установленным негативным влиянием АБП на костную ткань для нивелирования таких побочных эффектов со стороны стандартной антибиотикотерапии рекомендовано использование остеобиотиков.

Ведущей разработкой среди препаратов группы остебиотиков является «Остео-Вит D_3», который оказывает положительное влияние на гомеостаз и ремоделирование костной ткани, стимулирует остеогенез и минерализацию костной ткани, способствует повышению МПКТ и закрытию костных полостных образований.

«Остео-Вит D_3» является первым отечественным препаратом из группы остеобиотиков. Трутневое молочко, входящее в состав препарата, отличается высоким содержанием гормональных предшественников гонадного типа, благодаря этому безопасно стимулируется синтез эндогенного тестостерона и повышается численность остеобластов, отвечающих за минерализацию костной ткани [4]. Это позволяет задействовать для повышения МПКТ собственные кальциевые резервы организма, перенаправить макроэлемент из сосудов и мягких тканей в костную ткань.

Эффективность и высокий профиль безопасности остеобиотика «Остео-Вит D_3» доказаны многочисленными исследованиями во всех возрастных группах с различными костно-суставными патологиями, в том числе с повторными переломами на фоне остеопороза, с гонартрозом, вторичным остеопорозом при ревматоидном артрите, ревматоидным полиартритом с вторичным системным остеопорозом и наличием костных полостей.

© А. А. Пронькина, Д. Г. Елистратов, А. М. Косова, 2024

Так, в одном из исследований приняли участие 68 детей и подростков 9–17 лет (38 юношей и 30 девушек) с повторными переломами костей предплечья и наличием в них костных полостей. Пациентов разделили на две группы. В 1-й группе (n = 32) был назначен «Остео-Вит D_3» по 1 таблетке 2 раза в день, 3 курса по 3 месяца с месячными перерывами. Во 2-й группе были назначены препараты, содержащие те же вещества, что и «Остео-Вит D_3», кроме уникального компонента — HDBA органик-комплекса.

После года терапии у пациентов 1-й группы прирост МПКТ оказался большим, чем во 2-й группе: 3,7 и 3,1 % соответственно. Костные полости закрылись или уменьшились в размерах у 68 % детей из 1-й группы и у 43 % — у детей из 2-й группы. Также в 1-й группе отмечен лучший результат по восполнению дефицита витамина D в организме пациентов: 25(OH)D повысился у них до 47,0 ± 3,1 нг/мл, а во 2-й группе — до 30 ± 2,9 нг/мл. В 1-й группе на 1–2 недели раньше, чем во 2-й, зафиксирована консолидация переломов. Таким образом, «Остео-Вит D_3» показал высокую эффективность при отсутствии опасных побочных эффектов [5].

Увеличивается количество научных публикаций, посвященных проблеме негативного влияния антибиотиков на ось «кишечник — костная ткань» [3]. Представленные в этих работах результаты исследований позволяют рассматривать антибактериальную терапию как один из значимых факторов развития остеопении и остеопороза. В связи с этим в рамках профилактики и коррекции костных патологий на фоне применения АБП актуальной задачей является внедрение в медицинскую практику новой группы препаратов — остеобиотиков [1].

Литература

1. Hathaway-Schrader J. D., Steinkamp H. M., Chavez M. B. et al. Antibiotic Perturbation of Gut Microbiota Dysregulates Osteoimmune Cross Talk in Postpubertal Skeletal Development // Am. J. Pathol. 2019; 189 (2): 370–90. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.10.017.

2. Horton D. B., Scott F. I., Haynes K. et al. Antibiotic Exposure and Juvenile Idiopathic Arthritis: A Case-Control Study // Pediatrics. 2015; 136 (2): e333-43. DOI: 10.1542/peds.2015-0036.

3. Хавкин А. И., Новикова В. П., Вашура А. Ю., Ковтун Т. А. Ось микробиота — кость: современные представления о механизмах взаимодействия // Вопросы практической педиатрии. 2022; 17(5): 66–74. DOI: 10.20953/1817-7646-2022-5-66-74.

4. Сергеева-Кондраченко М. Ю., Мусатова Л. А., Радченко Л. Г. и др. Профилактика артритов и артрозов у детей. Почему нужны остеобиотики после антибиотиков? // Терапевт. 2024; 2.

5. Моисеева И. Я., Сергеева-Кондраченко М. Ю., Струков В. И. и др. Перспективы применения препаратов группы остеобиотиков при антибактериальной терапии // Терапевт. 2022; 10 (185): 31–7.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-344

ПЕРСПЕКТИВЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ НЕЙРОПАТИИ МЕТОДОМ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА

ADVANTAGES OF EARLY DIAGNOSIS OF CARDIOVASCULAR NEUROPATHY USING SPECTRAL ANALYSIS OF HEART RATE VARIABILITY

Е. А. Пыхтунова, А. А. Золотарев, С. И. Ксенева, В. В. Удут

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

E. A. Pykhtunova, A. A. Zolotarev, S. I. Kseneva, V. V. Udut

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Centre RAS

✉ p.ekaterina92@mail.ru

Аннотация

В работе представлены возможности и преимущества метода ранней диагностики кардиоваскулярной автономной нейропатии (КАН) с дальнейшим стадированием по результатам автоматизированного спектрального анализа вариабельности сердечного ритма (ВСР) на основании 10-минутной записи электрокардиограммы (ЭКГ).

Abstract

This study presents the possibilities and advantages of the method for early diagnosis of cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) with further staging based on the results of automated spectral analysis of heart rate variability (HRV) on the basis of 10-minute electrocardiogram (ECG) recording.

Во всем мире отмечается неуклонный рост распространенности сахарного диабета 2 типа (СД) и метаболического синдрома (МС). По данным IDF (2021) 10,5 % взрослого населения страдают СД, а к 2045 году он будет определяться у каждого 8-го жителя планеты. Ожидается увеличение распространенности и преддиабетических состояний, в том числе МС, с поражением до 471 миллиона человек в мире к 2035 году [1].

Кардиоваскулярная автономная нейропатия (КАН) — распространенное, но сложно выявляемое осложнение СД и МС. Гипергликемия при данных патологических состояниях оказывает нейрональное повреждение, приводящее к нарушению регуляции сердечно-сосудистой деятельности, проявляющееся фатальными последствиями — аритмией, безболевой ишемией миокарда и внезапной смертью. Современными исследованиями доказано, что на начальных стадиях КАН до определенной степени обратима при условии своевременного лечения, в свете чего актуальным является максимально раннее ее выявление.

На сегодняшний день золотым стандартом диагностики КАН являются кардиоваскулярные тесты: титл-тест, тест с глубоким дыханием, маневр Вальсальвы, холодовая вазоконстрикция, тест с динамометром [2]. В клинической практике их применимость затруднительна в связи с длительностью проведения тестирования (более одного часа), сложностью выполнения для пациента, неоднозначностью интерпретации результатов. Более объективную картину может дать сцинтиграфическое исследование с ^{123}I-метайодбензилгуанидином, демонстрирующее снижение поглощения данного радиофармпрепарата миокардом у лиц с КАН [3]. Однако использование радионуклидов сопряжено с рядом технических трудностей радиоизотопных исследований: воздействием радиации на организм испытуемого, необходимостью индивидуальной защиты персонала от радиоактивного излучения и значительными финансовыми затратами.

Известно, что ранним признаком КАН является угнетение активности симпатического отдела вегетативной нервной системы (ВНС), которая не отвечает активацией даже в ответ на проводимые тесты по оценке функционального состояния сердца. При этом фиксированный сердечный ритм у данных пациентов — отсутствие четкой зависимости частоты сердечного ритма от физической активности — свидетельствует о преобладании влияния надсегментарных структур на сердечный ритм. При проведении ВСР возможна оценка влияния симпатического отдела ВНС и надсегментарных структур на ритм сердца как в покое, так и на фоне физической активности (ортостатической пробы), что и легло в основу предлагаемого метода диагностики КАН (патент на изобретение RU

© Е. А. Пыхтунова, А. А. Золотарев, С. И. Ксенева, В. В. Удут, 2024

2585741 10.06.2016). Данный метод позволяет проводить и определение стадии КАН по степени угнетения активности симпатического отдела ВНС при наличии преобладания влияния надсегментарных структур на сердечный ритм, определяемого по вычисляемому по данным ВСР соотношению $\%LF_{ортопроба}/\%LF_{фон}$ (патент на изобретение RU 2817843 22.04.2024).

Нами было проведено обследование 50 пациентов (31–80 лет) с КАН на фоне СД или МС. Диагностика КАН основывалась на спектральном анализе ВСР по 10-минутной записи ЭКГ (5 минут лежа, затем 5 минут сразу после вставания) на основании коэффициентов: $\%LF_{ортопроба}/\%LF_{фон} < 1$; $\%VLF_{ортопроба}/\%VLF_{фон} > 1$. Стадирование основывалось на коэффициенте LF: I стадия: $\%LF_{ортопроба}/\%LF_{фон} = 1–0{,}7$; II стадия: $\%LF_{ортопроба}/\%LF_{фон} = 0{,}69–0{,}5$; III стадия: $\%LF_{ортопроба}/\%LF_{фон} < 0{,}5$.

В результате проведенного обследования выявлено, что среди пациентов с КАН у 30 % определяется I стадия и у 46 % — II стадия, что соответствует функциональным изменениям, полностью или частично обратимым на фоне как минимум стабильного гликемического контроля. У 24 % пациентов выявлена III стадия КАН — стадия анатомических нарушений, когда необходимо присоединение патогенетического лечения для предотвращения дальнейшего повреждения нервных структур.

Учитывая серьезное прогностическое значение КАН, необходимо ее максимально раннее выявление и лечение. Терапия КАН представляется наиболее эффективной именно на ранней, в том числе субклинической стадии, в связи с чем предложенный способ диагностики КАН с определением ее стадий представляет несомненный практический интерес для определения степени обратимости и возможности коррекции на начальных этапах формирования данной патологии.

Литература

1. Eleftheriadou A., Williams S., Nevitt S. et al. The prevalence of cardiac autonomic neuropathy in prediabetes: a systematic review // Diabetologia. 2021. Vol. 64 (2). P. 288–303.

2. Зеленина Т. А., Салухов В. В., Земляной А. Б. и др. Нарушение микроциркуляторного кровотока у больных сахарным диабетом 2 типа и кардиоваскулярной автономной нейропатией // Сахарный диабет. 2021. Vol. 24(1). P. 32–44.

3. Kaze A. D., Fonarow G. C., Echouffo-Tcheugui J. B. Cardiac autonomic dysfunction and risk of silent myocardial infarction among adults with type 2 diabetes // Journal of the American Heart Association. 2023 Vol. 12(20). e029814.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-345

ЧАСТИЧНОЕ СТРУКТУРОСПЕЦИФИЧНОЕ ПОДАВЛЕНИЕ 5-HT4-РЕЦЕПТОРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ КОРРЕКЦИИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЙ *

PARTIAL STRUCTURE-SPECIFIC SUPPRESSION OF THE 5-HT4 RECEPTOR AS A POTENTIAL MECHANISM FOR CORRECTING BEHAVIORAL PATHOLOGIES

Н. С. Радченко[1,2], Т. В. Ильчибаева[1], В. С. Науменко[1]

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

N. S. Radchenko[1,2], T. V. Ilchibaeva[1], V. S. Naumenko[1]

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

✉ radchenko-nikita2001@yandex.ru

Аннотация

Большинство исследований *in vivo*, посвященных изучению функции 5-HT4-рецепторов, основывались на системных фармакологических подходах или конститутивной делеции. Поэтому изучение роли 5-HT4-рецепторов в конкретной структуре мозга будет способствовать лучшему пониманию их функции. При помощи РНК интерференции мы провели нокдаун гена *Htr4* и изучили паттерны поведения, регулируемые 5-HT4-рецепторами.

Abstract

Most *in vivo* studies on the function of 5-HT4 receptors have been based on system pharmacological approaches or constitutive deletion. Therefore, studying the role of 5-HT4 receptors in a specific brain structure will contribute to a better understanding of their function. Using RNA interference, we performed a knockdown of the *Htr4* gene and studied patterns of behavior regulated by 5-HT4 receptors.

Серотониновый рецептор 4 подтипа (5-HT4) высоко экспрессируется во многих областях мозга, связанных с настроением и тревогой. Активация данного типа рецепторов имеет антиамнестический эффект. Большинство исследований *in vivo*, посвященных изучению функции 5-HT4-рецепторов, основывались на системных фармакологических подходах или конститутивной делеции. Поэтому изучение локальной роли 5-HT4-подтипа в конкретной структуре мозга будет способствовать лучшему пониманию их функции.

Цель работы — оценка эффектов нокдауна 5-HT4-рецепторов в гиппокампе и во фронтальной коре на поведение взрослых мышей линии C57Bl/6. Мы разработали аденоассоциированный вирусный конструкт pAAV-Syn(0.5)-EGFP-H1-2-shRNA-HTR4, который кодирует shRNA, способную снизить экспрессию гена целевого рецептора (*Htr4*). Вирусные частицы были предварительно наработаны в клетках линии HEK293-FT.

Было проведено 2 последовательных эксперимента. В первом эксперименте самцам мышей вводили вирусный вектор в гиппокамп. Второй эксперимент проводили аналогично первому, но инъекция проводилась в ткань префронтальной коры головного мозга. Через 3 недели после операции провели тестирование поведения животных. Поведение изучали в тестах «Открытое поле» (ОП), «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ), «Подвешивание за хвост» (ПЗХ), «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ), «Распознавание нового объекта» (РНО). Подавление экспрессии гена определяли при помощи ПЦР в реальном времени.

Подавление экспрессии при помощи shRNA привело к значимому снижению уровня мРНК 5-HT4 в гиппокампе ($p = 0{,}009$). В тесте ОП нокдаун гена Htr4 привел к увеличению исследовательской и двигательной активности: увеличены исследованная площадь арены ($p = 0{,}001$) и пройденный путь ($p = 0{,}0004$). У опытной группы снижено латентное ($p = 0{,}038$) и суммарное время груминга ($p = 0{,}028$), что указывает на уменьшение тревожности. Также тенденция к уменьшению уровня тревожности выявлена в тесте ПКЛ: опытные животные проводили больше времени в открытых рукавах лабиринта ($p = 0{,}059$). В тесте ПЗХ опытные и контрольные животные демонстрировали схожие показатели поведенческой беспомощности ($p = 0{,}947$). В тесте ВЛМ веро-

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-15-00011).

© Н. С. Радченко, Т. В. Ильчибаева, В. С. Науменко, 2024

ятность нахождения опытных животных в целевом секторе не отличалась от случайной (p = 0,176), что говорит о худшем формировании пространственной памяти у опытных животных.

При подавлении экспрессии во фронтальной коре при помощи shRNA показано значимое снижение уровня мРНК 5-HT4 (p = 0,041). В тесте ОП нокдаун гена Htr4 не привел к изменениям в поведении. Обнаружено изменение уровня тревожности в тесте ПКЛ: опытные животные проводили больше времени в закрытых рукавах лабиринта (p = 0,003), меньше времени проводили в открытых рукавах (p = 0,001), кроме того, снижена доля исследованной площади (p = 0,00). В тесте ПЗХ опытные и контрольные животные демонстрировали схожие показатели поведенческой беспомощности (p = 0,193). В тесте РНО не обнаружено разницы в индексах дискриминации (p = 0,286) и предпочтения (p = 0,287), что говорит об отсутствии влияния нокдауна *Htr4* на формирование долговременной памяти у опытных животных.

В нашей работе впервые было показано, что нокдаун гена *Htr4* приводит к различным эффектам поведения в зависимости от структуры мозга, в которой он экспрессируется. Так, нокдаун *Htr4* в гиппокампе приводит к снижению тревожности и функции памяти, а при нокдауне в префронтальной коре наблюдается усиление тревожно-подобного поведения без влияния на поведенческую беспомощность или функцию памяти.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-346

КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕПТИДОМИМЕТИКА ДЛЯ ТЕРАПИИ РАН, ОСЛОЖНЕННЫХ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОЙ ФЛОРОЙ *

COMPOSITE MATERIALS BASED ON POLYCAPROLACTONE AND ANTIBACTERIAL PEPTIDE FOR THE TREATMENT OF WOUNDS COMPLICATED BY ANTIBIOTIC-RESISTANT FLORA

Д. В. Риппинен[1], И. М. Соловьева[1], В. С. Овчинников[1], Д. В. Ярославцев[1], А. Ю. Алексеев[2], А. С. Скорупо[2], А. О. Соловьева[1]

[1]НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск
[2]НИИ вирусологии Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины, Новосибирск

D. V. Rippinen[1], I. M. Soloveva[1], V. S. Ovchinnikov[1], D. V. Yaroslavtsev[1], A. Yu. Alekseev[2], A. S. Skorupo[2], A. O. Soloveva[1]

[1]Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk
[2]Research Institute of Virology Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk

✉ solovevaao@mail.ru

Аннотация

Работа посвящена разработке и исследованию антибактериальных материалов, полученных методом электроформования, для терапии ран с антибиотикоустойчивой флорой. Была продемонстрирована высокая антибактериальная активность, низкая цитотоксичность, равномерное пролонгированное время выхода антибактериального агента в среду.

Abstract

The work is devoted to the development of antibacterial materials obtained by electrospinning for the treatment of wounds with antibiotic-resistant flora. High antibacterial activity, low cytotoxicity, uniform prolonged release time of the antibacterial agent into the environment were demonstrated.

Устойчивость к антибиотикам представляет собой серьезный вызов для современного общества и мирового здравоохранения. Короткие антимикробные пептиды (АМП) за счет своей высокой активности и отсутствия специфических механизмов защиты у бактерий имеют потенциал в качестве альтернативных антибактериальных агентов.

На сегодняшний день идентифицировано более 3000 АМП, но только часть из них одобрена для клинических испытаний. Их клиническое применение ограничено системной токсичностью, восприимчивостью к деградации протеазами, короткого периода полураспада и быстрого почечного клиренса. Эти ограничения являются основными препятствиями для успеха АМП в качестве коммерческих лекарств.

Иммобилизация на/в наноматериалы — один из перспективных подходов для их доставки. В качестве доставки пептидов в материалы используются различные подходы, в том числе совместное электроформование пептидов с полимерами синтетической и натуральной природы. Однако за счет маленьких размеров АМП быстро элиминируются из волокон (в течение 60 минут выходит 85 %) [1]. Поликапролактон является биодеградируемым синтетическим полимером, отличается низкой токсичностью, одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами, активно применяется в медицине.

В данной работе используется синтетический антимикробный пептидомиметик (LTX-109), полученный методом синтеза пептидов в растворе, отличающийся устойчивостью к протеолитическому расщеплению за счет малых размеров молекулы: всего 0,8 кДа по сравнению, например, с дефензинами (2–6 кДа), и присутствием модифицированного триптофана и концевой фенэтильной группы.

Пептидомиметик вводили в состав волокон при совместном электроформовании при отработанных режимах. Сложность эффективной интеграции в наноматериалы антибактериальных пептидов — быстрая скорость их выхода. В нашем исследовании мы продемонстрировали сохранение пептидов в составе нановолокон в течение

* Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки РФ, номер темы FWNR-2022-0009.

© Д. В. Риппинен, И. М. Соловьева, В. С. Овчинников, Д. В. Ярославцев, А. Ю. Алексеев, А. С. Скорупо, А. О. Соловьева, 2024

2 недель непрерывного вымачивания в физиологической жидкости (вышло всего 20 % пептида) при сохранении высокой антибактериальной активности (продемонстрированная на *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923, *S. Typhimurium* ATCC14028, *P. aeruginosa* ATCC27853, Candida albicans).

Помимо этого, была продемонстрирована низкая токсичность полученных материалов на мезенхимальные стромальные клетки, культивированные на их поверхности. Токсичность была оценена при помощи флуоресцентного микроскопа и окрашивании клеток ДНК-интеркалирующими красителями Hoechst и йодида пропидия. Данный способ позволяет оценить общее количество клеток и их жизнеспособность. В результате было показано, что количество клеток не отличается значимо между PCL-ref (исходный материал, состоящий только из поликапролактона) и PCL-LTX-109 (с концентрациями пептидомиметика в материале от 0,125 до 1 %).

Таким образом, было показано, что композиционные материалы, полученные методом электроформования на основе поликапролактона и содержащие в своем составе антибактериальный пептидомиметик в различных концентрациях, имеют продолжительную высокую антибактериальную активность при низкой цитотоксичности.

Литература

1. Eriksen T. H. B., Skovsen E. and Fojan P. Release of antimicrobial peptides from electrospun nanofibres as a drug delivery system // J. Biomed. Nanotechnol. Vol. 9. № 3. P. 492–498, 2013.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-347

РАЗРАБОТКА ИНФАРКТНОЙ МОДЕЛИ КРЫСИНОГО СЕРДЦА ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

DEVELOPMENT OF WHOLE-ANIMAL RAT HEART INFARCTION MODEL FOR CELL THERAPY TESTING

С. Д. Робустова[1], Е. А. Турчанинова[1], В. Д. Джабраилов[1], Д. В. Кононова[1], А. А. Аитова[1], В. А. Цвелая[1–3], К. И. Агладзе[1,2]

[1]*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*
[2]*Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского*
[3]*Альметьевский государственный нефтяной институт*

S. D. Robustova[1], E. A. Turchaninova[1], V. D. Dzhabrailov[1], D. V. Kononova[1], A. A. Aitova[1], V. A. Tsvelaya[1–3], K. I. Agladze[1,2]

[1]*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*
[2]*Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute*
[3]*Almetyevsk State Oil Institute*

✉ robustova@gmail.com

Аннотация

Ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда — серьезные медицинские состояния, приводящие к внезапной сердечной смерти и сердечной недостаточности. Для предотвращения этих последствий предложена терапия на основе мезенхимальных стволовых клеток. Сейчас для ее тестирования ведется разработка стабильной и воспроизводимой крысиной инфарктной модели.

Abstract

Ischemic heart disease and myocardial infarction are severe medical conditions causing sudden cardiac death. In order to prevent these consequences an MSC-based cell therapy is proposed. For testing of this therapy a stable and reproducible whole-animal rat infarction model is now in development.

Структурные нарушения сердца, в особенности ишемическая болезнь и инфаркт миокарда, часто становятся причиной внезапной сердечной смерти [1]. В медицинской практике на сегодняшний день для устранения первичных последствий инфаркта миокарда осуществляется реперфузионная терапия и установка коронарных стентов. Также проводится поддерживающая медикаментозная терапия, призванная снизить нагрузку на сердце, уменьшить болевой синдром и предотвратить повторную закупорку коронарных сосудов. Несмотря на проводимые мероприятия, остается некротическая зона, и собственный регенеративный потенциал сердца не позволяет заместить мертвые ткани новыми сократительными клетками, поэтому продолжает быть актуальным вопрос о создании клеточной терапии, которая бы справилась с этой задачей.

Уже ведутся исследования способов восстановления сердечной ткани с помощью клеточной терапии. Перспективными с этой точки зрения являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), так как их использование сопряжено с меньшим риском образования тератом [2], чем индуцированных плюрипотентных стволовых клеток или эмбриональных стволовых клеток. Существуют протестированные способы получения МСК из биопсии костного мозга и их последующей трансдифференцировки в кардиомиоциты.

Целью данной работы является создание животной инфарктной модели для тестирования возможности применения МСК для клеточной терапии. В задачи входят выбор схемы моделирования инфаркта, создание и тестирование установки для проведения операции, отработка воспроизводимости результатов моделирования инфарктной зоны, подбор и тестирование системы таргетной доставки [3] дифференцированных клеток.

В данной работе была выбрана классическая схема моделирования инфаркта с наложением лигатуры на переднюю межжелудочковую ветвь левой коронарной артерии. Другие методы, в частности, термическая абляция, на практике показали свою низкую эффективность. Наложение лигатуры на коронарный сосуд прово-

© С. Д. Робустова, Е. А. Турчанинова, В. Д. Джабраилов, Д. В. Кононова, А. А. Аитова, В. А. Цвелая, К. И. Агладзе, 2024

дится при вскрытой грудной клетке, что не позволяет животному дышать самостоятельно, поэтому была собрана и протестирована установка для искусственной вентиляции легких. На данном этапе было проведено несколько успешных операций по моделированию инфаркта.

Литература

1. Kuriachan V. P., Sumner G. L., Mitchell L. B. Sudden cardiac death // Current problems in cardiology. 2015. 40(4). P. 133–200.

2. Wakao S., Kuroda Y., Ogura F., Shigemoto T., Dezawa M. Regenerative Effects of Mesenchymal Stem Cells: Contribution of Muse Cells, a Novel Pluripotent Stem Cell Type that Resides in Mesenchymal Cells // Cells. 2012. 1(4). P. 1045–1060.

3. Aitova A., Scherbina S., Berezhnoy A., Slotvitsky M., Tsvelaya V., Sergeeva T., Turchaninova E., Rybkina E., Bakumenko S., Sidorov I., Popov M. A., Dontsov V., Agafonov E. G., Efimov A. E., Agapov I., Zybin D., Shumakov D., Agladze K. Novel Molecular Vehicle-Based Approach for Cardiac Cell Transplantation Leads to Rapid Electromechanical Graft-Host Coupling // International journal of molecular sciences. 2023. 24(12). P. 10406.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-348

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ PENICILLIUM THYMICOLA ФУМИХИНАЗОЛИНА F И G

ANTITUMOR PROPERTIES OF SECONDARY METABOLITES OF PENICILLIUM THYMICOLA FUMIQUINAZOLINE F AND G

Г. К. Рысцов, Т. В. Антипова, М. Г. Шляпников, Ж. В. Ренфельд, М. Ю. Земскова

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина РАН, Пущино

G. K. Rystsov, T. V. Antipova, M. G. Shlyapnikov, J. V. Renfeld, M. Yu. Zemskova

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino

✉ gleb.8.ristsoff@gmail.com

Аннотация

В настоящем исследовании была исследована активность вторичных метаболитов гриба P. thymicola фумихиназолинов F и G на клетки рака молочной железы человека. Было показано, что эти соединения подавляют пролиферацию и миграцию опухолевых клеток и ингибируют процесс эпителиально-мезенхимной трансформации, что приводит к частичному реверсированию состояния злокачественных клеток к менее патологическому фенотипу.

Abstract

This work examined the effects on human breast cancer cells of fumiquinazolines F and G, secondary metabolites of the fungus P. thymicola. Our findings show that these substances restrict the epithelial-mesenchymal transition process and prevent tumor cell migration and proliferation, which partially reverts malignant cells to a less pathogenic state.

Вторичные метаболиты грибов рода Penicillium — многообещающий источник новых химических соединений, которые могут найти применение в медицине. Например, выделенные из культуральной среды P. thymicola фумихиназолины F и G (стереоизомеры) обладают способностью ингибировать рост бактерий, низших грибов и клеток лимфолейкоза мышей, но характер ингибирующего воздействия и его механизмы не были установлены. Целью нашего исследования являлось определить биологическую активность фумихиназолинов F и G относительно клеток рака молочной железы (РМЖ).

В данной работе была использованы различные по степени агрессивности клеточные линии РМЖ. MCF-7 — наименее агрессивная клеточная линия, BT474 — клеточная линия, имеющая более агрессивный фенотип и MDA-MB-231 — инвазивная и малодифференцированная линия клеток трижды негативного РМЖ.

Показано, что фумихиназолины наиболее эффективно ингибируют рост гормонозависимой линии MCF-7. Однако они также способны ингибировать рост клеток MDA-MB-231, хотя и с меньшей эффективностью, чем это наблюдается для MCF-7 и BT474. Следует отметить, что клетки MCF-7 и BT474 имеют эпителиальный фенотип, в то время как MDA-MB-231 потеряли свойства эпителиальных клеток и приобрели более агрессивный мезенхимальный фенотип вследствие эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМП).

Для определения механизма ингибирования был проведен анализ клеточной гибели с использованием AnnexinV и анализ клеточного цикла клеток MDA-MB-231 в присутствии различных концентраций фумихиназолина F. Показано, что метаболит обладает незначительными цитоксическими свойствами, однако блокирует клеточное деление, что наблюдается по накоплению клеток в фазе G1 и соответствующим уменьшением количества клеток в фазах S (репликация) и G2 (митоз). Следовательно, фумихиназолин F имеет комбинированное цитотоксическое и цитостатическое действие.

Также было установлено, что фумихиназолин F ингибирует миграцию клеток MDA-MB-231 через пористую мембрану по градиенту хемоаттрактанта. Известно, что миграция клеток зависит от белков, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, а именно — виментина (структурный белок промежуточных филаментов), CD44 (интегральный гликопротеин и рецептор компонентов межклеточного матрикса) и э-кадгерина (мембранный гликопротеин, образующий межклеточные контакты). Уровни экспрессии этих факторов определяют фенотип опухолевых клеток, эпителиальный (высокое содержание э-кадгерина, низкое виментина и CD44) и мезенхимальный (высокое содержание виментина и CD44, низкое э-кадгерина). Посредством иммунофер-

© Г. К. Рысцов, Т. В. Антипова, М. Г. Шляпников, Ж. В. Ренфельд, М. Ю. Земскова, 2024

ментного анализа показано, что фумихиназолин F снижает уровень виментина и повышает уровень э-кадгерина в клетках MDA-MB-231. Наблюдаемый эффект усиливается с увеличением времени обработки и повышением концентрации соединения, что позволяет предположить частичный реверс клеток к менее патологическому фенотипу. Как известно, CD44 играет важную роль в миграции и адгезии. Посредством вестерн-блот анализа было установлено, что фумихиназолин F дозозависимо снижает уровень белка CD44 в клетках MDA-MB-231, несмотря на то, что экспрессия мРНК CD44 не меняется. В экспериментах ингибирования синтеза белка *de novo* было установлено, что снижение уровня CD44 связано с уменьшением его стабильности под воздействием фумихиназолина F.

Основная функция CD44 — регулирование миграции клеток за счет узнавания и связывания компонентов межклеточного матрикса. Нами было показано, что фумихиназолин F в 1,6 раза снижает способность клеток MDA-MB-231 прикрепляться к субстрату, что, вероятно, связано с уменьшением количества CD44. Белки, изменение экспрессии которых мы наблюдали под воздействием фумихиназолинов, относятся к маркерным белкам ЭМП — комплексного процесса, связанного с изменением фенотипа опухолевых эпителиальных клеток на мезенхимальный. Такие клетки обладают повышенной способностью к миграции и инвазии. Появление мезенхимальных клеток в опухоли приводит к распространению раковых клеток в организме и образованию метастаз. Например, известно, что ингибирование экспрессии CD44 в опухолевых клетках подавляет их способность к миграции и инвазии, замедляет развитие онкозаболеваний и снижает устойчивость опухоли к терапии. Полученные данные предполагают, что вторичные метаболиты гриба P. thymicola фумихиназолины F и G обладают противоопухолевой активностью вследствие их способности ингибировать деление опухолевых клеток РМЖ и индуцировать частичную реверсию ЭМП, что вызывает возврат злокачественных клеток к менее патологическому фенотипу.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-349

АНАТОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРАНИОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ

ANATOMICAL JUSTIFICATION OF THE USE OF CRANIOMETRIC INDICATORS IN RECONSTRUCTIVE MAXILLOFACIAL SURGERY

К. Т. Саргсян[1], О. В. Слесарев[1], М. В. Комарова[2]

[1]*Самарский государственный медицинский университет*
[2]*Самарский национальный исследовательский университет им. С. П. Королева*

K. T. Sargsyan[1], O. V. Slesarev[1], M. V. Komarova[2]

[1]*Samara State Medical University*
[2]*Samara National Research University*

✉ sukasyan_karina@mail.ru

Аннотация

Корректный расчет пространственного расположения эндопротеза ВНЧС по отношению к другим костям черепа возможен по краниометрическим ориентирам рентгеновских изображений ВНЧС, полученных методом КЛКТ. 3D-моделирование должно опираться на достоверно выявляемые краниометрические ориентиры, позволяющие проводить не только 3D-моделирование скульптуры анатомического органа, но и 3D-планирование его установки в реципиентное ложе.

Abstract

The correct calculation of the spatial location of the TMJ endoprosthesis in relation to other bones of the skull is possible according to the craniometric landmarks of the TMJ X-ray images obtained by the CBCT method. 3D modeling should be based on reliably detectable craniometric landmarks, allowing not only 3D modeling of the sculpture of the anatomical organ, but also 3D planning of its installation in the recipient bed.

Введение

Оптимизация анализа рентгеновских изображений костных структур височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС), полученных методом конусно-лучевой компьютерной томографии (КЛКТ), актуальная проблема современной стоматологии. Использование КЛКТ как высокотехнологичного и достоверного метода исследования целесообразно для проведения прижизненных краниометрических исследований костей черепа по рентгеновскому изображению [1–4].

Цель — разработать краниометрические показатели, выявляемые методом конусно-лучевой компьютерной томографии костей черепа для определения положения головки нижней челюсти в пространстве нижнечелюстной ямки височной кости.

Материалы и методы

Проведено ретроспективное исследование 111 историй болезни пациентов, которым проводилось обследование костей лицевого и мозгового отделов черепа методом КЛКТ. Возраст пациентов составил от 25 до 64 лет, средний возраст 32 года, среди них: 35 женщин и 76 мужчин. Исследован 21 КЛКТ пациентов, диагноз которых соответствовал протоколу дизайна исследования. Использовались КЛКТ с разрешением вокселя 0,3 мм на аппарате Planmeca ProMax 3D Classic (Финляндия).

В аксиальной проекции выявляли рентгеноанатомические ориентиры краниометрических точек, которые соответствовали критериям краниометрической точки. Алгоритм определения краниометрической точки по изображению костей черепа в аксиальной проекции КЛКТ включает: определение срединно-сагиттальной и фронтальной плоскостей ГНЧ и краниометрической точки ГНЧ, образованной точкой пересечения этих плоскостей; определение краниометрической точки венечного отростка нижней челюсти, сошника и клиновидной кости; построение по краниометрическим точкам рентгеноанатомических плоскостей; определение угловых зависимостей и устойчивых рентгеноанатомических взаимосвязей между построенными плоскостями.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли в среде пакета SPSS 25. Описательные статистики представлены средними и стандартным отклонением (M ± SD), а также медианами (Me) и квартиля-

© К. Т. Саргсян, О. В. Слесарев, М. В. Комарова, 2024

ми (Q1, Q3). В работе использованы парный критерий Стьюдента, коэффициент корреляции Пирсона. Для визуализации данных применяли скаттерограммы и диаграммы Альтмана. Критическое значение рпринимали равным 0,05.

Результаты

Для анализа рентгеноанатомических изображений костей черепа, полученных методом КЛКТ в аксиальной проекции, определены краниометрические точки и краниометрические показатели, которые необходимо использовать при 3D-моделировании биоинженерной конструкции головки и ветви нижней челюсти. Анализ КЛКТ костей черепа в аксиальной проекции позволил определить, что при пересечении срединно-сагиттальной и фронтальной плоскостей ГНЧ образуется угол в 90°. Угол, образованный срединно-сагиттальными плоскостями ГНЧ и ветви нижней челюсти, составляет от 2,5 до 4,4 градусов.

Выводы

Выявлены стабильные краниометрические координаты срединно-сагиттальной и фронтальной плоскостей головки нижней челюсти, позволяющие проводить позиционирование эндопротеза в пространстве нижнечелюстной ямки височной кости и последующую корректную его фиксацию к ветви нижней челюсти.

Литература

1. Найданова И. С. Особенности функциональных нарушений височно-нижнечелюстного сустава и жевательных мышц у молодых пациентов с сохраненными зубными рядами: авторефер. дис. … к.м.н. / И. С. Найданова. Чита, 2020. 12 с.

2. Потапов В. П. Этиология, патогенез, диагностика и комплексное лечение больных с заболеваниями височно-нижнечелюстного сустава, обусловленных нарушением функциональной окклюзии / В. П. Потапов. Самара: ООО «Издательско-полиграфический комплекс “Право”», 2019. 225 с.

3. Дробышев А. Ю. Заболевания височно-нижнечелюстного сустава / А. Ю. Дробышев. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. 329 с.

4. Доменюк Д. А., Давыдов Б. Н., Дмитриенко С. В. и соавт. Диагностические возможности конусно-лучевой компьютерной томографии при проведении краниоморфологических и краниометрических исследований в оценке индивидуальной анатомической изменчивости (Часть III) // Научно-практический журнал. Институт Стоматологии № 2(83), июнь, 2019. С. 48–53.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-350

РАЗРАБОТКА ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ КАК ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА РАНЕВЫХ ПОВЯЗОК *

DEVELOPMENT OF A THERMOSENSITIVE POLYMER MATRIX AS THE MAIN COMPONENT FOR WOUND DRESSINGS

С. М. Сафарян[1], Г. О. Нифонтова[1], Ю. М. Ефремов[1], Е. М. Зубанова[2], Е. Н. Голубева[2], С. В. Костюк[1,3], И. А. Березянко[1,3], П. С. Тимашев[1], А. И. Шпичка[1]

[1]*Институт регенеративной медицины Сеченовского университета, Москва*
[2]*Химический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*
[3]*Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск*

S. M. Safaryan[1], G. O. Nifontova[1], Yu. M. Efremov[1], E. M. Zubanova[2], E. N. Golubeva[2], S. V. Kostyuk[1,3], I. A. Berezyanko[1,3], P. S. Timashev[1], A. I. Shpichka[1]

[1]*Institute for Regenerative Medicine Sechenov University, Moscow*
[2]*Faculty of Chemistry Moscow State University*
[3]*Research Institute of Physico-Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk*

✉ safaryan_s_m@staff.sechenov.ru

Аннотация

В данной работе рассматриваются различные структурные и физико-химичесткие свойства наногелевой матрицы на основе сополимеров N-изопропилакриламида (НИПАМ) с регулируемым температурным переходом в пределах от 30 до 40 °С. Обсуждается стабильность матрицы и ее потенциальное использование в качестве основы для контролируемой загрузки лекарственных препаратов при лечении ожогов.

Abstract

This work considers structural and physicochemical properties of a nanogel matrix based on N-isopropylacrylamide (NIPAM) copolymers with a controlled temperature transition in the range from 30 to 40 °C. The stability of the matrix and its potential use for controlled drug loading in the treatment of burns are discussed.

Термические поражения кожи являются актуальной проблемой в современной медицине. При лечении ожогов важным является выбор оптимальных местных раневых покрытий, их эффективных комбинаций с физиотерапевтическими методами лечения, а также профилактика раневых инфекций.

Основные применяемые методы лечения ожогов, включая аутодермопластику, имеют ряд ограничений и часто недостаточную эффективность. Классические раневые покрытия, перевязочные материалы и бинты, помимо недостаточной атравматичности и мягкости, не имеют антибактериальных, анестетических, противовоспалительных и других активных свойств, критически важных для быстрого и эффективного заживления.

Таким образом, возникает необходимость создания новых функциональных раневых покрытий медицинского назначения для лечения различных видов ран и ожогов, которые отвечали бы обозначенным выше требованиям.

Одним из способов достижения поставленной цели является использование термочувствительных гидрогелей как основы раневых покрытий для контролируемой доставки терапевтических агентов на разных стадиях заживления (антибиотиков и/или противовоспалительных препаратов на начальной стадии и факторов роста на последующих стадиях) под действием внешних факторов, к которым относятся локальная температура в области повреждения. Известно, что локальная температура в области ожогов выше средней температуры тела, и она меняется по мере заживления.

Планируется, что при использовании раневого покрытия с термочувствительной матрицей лекарственные компоненты будут выделяться в нужной последовательности по мере уменьшения температуры раны (от ~38 до 32 °С) за счет разной температуры коллапса полимерных гелей.

* Работа выполнена при поддержке РНФ-БРФФИ «Микрогелевая система доставки терапевтических средств с управляемым высвобождением для лечения ожоговых поражений кожи» (проект № 24-45-10012).

© С. М. Сафарян, Г. О. Нифонтова, Ю. М. Ефремов, Е. М. Зубанова, Е. Н. Голубева, С. В. Костюк, И. А. Березянко, П. С. Тимашев, А. И. Шпичка, 2024

В данной работе рассматриваются различные структурные и физико-химические свойства, а также температурные переходы наногелей на основе сополимеров N-изопропилакриламида (НИПАМ) с регулируемой нижней критической температурой растворения (НКТР) в пределах от 30 до 40 °С за счет сополимеризации НИПАМ с гидрофильными мономерами и сшивающими агентами.

Методом АСМ было показано, что частицы имеют однородную сферическую структуру с диаметром порядка 300 нм. Методом динамического светорассеивания (DLS) также была показана однородная структура частиц наногеля с гидродинамическим диаметром порядка 300 нм и узким распределением по размеру. Эта однородность сохранялась при разных значениях pH (в диапазоне pH5-pH8), а также после автоклавирования раствора частиц при 126 °С.

Температурные переходы наногеля были продемонстрированы с помощью методов ЭПР и DLS при нагревании. Было показано, что при нагревании до 32 °С и выше частицы начинают сжиматься и уменьшаются в размерах вплоть до 100 нм. Методом ЭПР с захватом спинового зонда была продемонстрирована способность полимерной матрицы к захвату флуоресцентных меток при нагревании в диапазоне 32–40 °С.

Таким образом, был охарактеризован наногель на основе сополимеров НИПАМ, была показана его стабильность и стимул-чувствительные свойства (температурный переход). Это дает основания использовать данную полимерную матрицу для контролируемой загрузки и высвобождения молекул. В частности, разрабатываемая полимерная конструкция является перспективной основой для создания раневой гидрогелевой повязки для лечения ожогов с локальным термочувствительным высвобождением лекарственных препаратов, стимулирующих заживление. В дальнейшей работе планируется исследовать данный подход на ожоговых мышиных моделях.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-351

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ЭКСПРЕССИИ *HIF1A* И *NFKB1* И СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ HIF-1A И VNN1 У ПАЦИЕНТОВ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ*

INDIVIDUAL DIFFERENCES IN *HIF1A* AND *NFKB1* EXPRESSION AND HIF-1A AND VNN1 PROTEIN CONTENT IN CARDIAC PATIENTS

М. В. Силина, Д. Ш. Джалилова, О. О. Гринь, М. А. Бабаев, О. В. Макарова

Российский научный центр хирургии им. Б. В. Петровского, Москва

M. V. Silina, D. Sh. Dzhalilova, O. O. Grin', M. A. Babaev, O. V. Makarova

Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow

✉ marusyasilina99@yandex.ru

Аннотация

Высокая концентрация белков HIF-1α и VNN1 в сыворотке крови у кардиохирургических пациентов мужского пола с расслаивающей аневризмой аорты до операции, а также через 24 и 72 ч после нее может быть прогностическим признаком развития послеоперационных осложнений.

Abstract

High serum levels of HIF-1α and VNN1 proteins in male cardiac surgical patients with aortic dissecting aneurysm before surgery and 24 and 72 h after this may be a prognostic sign of postoperative complications.

Основным регулятором клеточного ответа на воспаление является ядерный фактор каппа B (NF-kB). В последние годы появляется все больше данных о взаимосвязи NF-κB и транскрипционных факторов семейства HIF (Hypoxia-Inducible Factor), которые управляют клеточным ответом на гипоксию.

Другим регулятором экспрессии и активности HIF-1α является цистеамин — продукт гидролиза пантетеина, который катализирует пантетеиназа ванин-1 (VNN1), влияющая на клеточный ответ на окислительный стресс и воспаление [1, 2]. Также показано, что в первые дни после госпитализации у пациентов с сепсисом относительно пациентов без него отмечался более высокий уровень белка VNN1 [3]. Ранее нами показано, что существуют индивидуальные различия в реакции на гипоксическое воздействие, во многом обусловленные разным уровнем HIF, а организмы с высокой и низкой устойчивостью к гипоксии отличаются по тяжести течения системного воспалительного ответа [4, 5].

Цель исследования — выявить индивидуальные различия уровней экспрессии *HIF1A* и *NFKB1* в лейкоцитах периферической крови, а также содержания белков HIF-1α и VNN1 в сыворотке крови у пациентов кардиохирургического профиля после операций по поводу расслаивающей аневризмы аорты.

Исследование проведено с использованием образцов крови 26 кардиохирургических пациентов мужского пола в возрасте от 20 до 72 лет с расслаивающей аневризмой аорты. Признаки синдрома системного воспалительного ответа (ССВО) после операций наблюдались у 10 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). Венозную кровь забирали до операции, а также на 1 и 3 сутки после нее. Уровни экспрессии мРНК *HIF1A* и *NFKB1* в клетках периферической крови определяли методом ПЦР в реальном времени относительно уровня экспрессии *GAPDH*. Концентрацию белков HIF-1α и VNN1 в сыворотке определяли методом ИФА.

С целью выявления индивидуальных различий содержания белков HIF-1α и VNN1 в сыворотке, а также уровней экспрессии *HIF1A* и *NFKB1* в клетках периферической крови у пациентов кардиохирургического профиля проводили кластерный анализ по всем исследованным показателям (метод Ворда). Различия между группами Кластер 1 (К1) и Кластер 2 (К2) оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Данные выражали в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (25–75 %). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки значимости достоверно различающихся показателей вычисляли информативность каждого признака по формуле Кульбака:

$$I_{M1-M2} = 1,0857 \times \left[\left(\sigma_1 / \sigma_2\right)^2 + \left(\sigma_2 / \sigma_1\right)^2 - 2 + \left(\frac{1}{\sigma_1^2} + \frac{1}{\sigma_2^2} \right) \times \left(M1 - M2\right)^2 \right].$$

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 123030700027-5.

© М. В. Силина, Д. Ш. Джалилова, О. О. Гринь, М. А. Бабаев, О. В. Макарова, 2024

В ходе проведения кластерного анализа пациенты были разделены на 2 группы К1 и К2. Содержание белков HIF-1α и VNN1 в сыворотке крови у пациентов К2 было статистически значимо выше до операции, на первый и на третий дни после операционного вмешательства. Уровни экспрессии *HIF1A* в клетках периферической крови не различались до и на первые сутки после операционного вмешательства, однако были выше у пациентов К1 на третий день по сравнению с К2. При оценке уровней экспрессии *NFKB1* в клетках периферической крови статистически значимые различия между пациентами К1 и К2 выявлены не были. Также показано, что содержание HIF-1α в сыворотке крови до оперативного вмешательства имеет максимальное значение информативности среди исследуемых показателей.

Полученные данные можно использовать для разработки подходов к индивидуальному прогнозированию тяжести течения сепсиса и ССВО, что повысит эффективность терапии и позволит снизить показатели смертности.

Литература

1. Bartucci R. et al. Vanin 1: its physiological function and role in diseases // International Journal of Molecular Science. 2019. № 20 (16). P. 3891.

2. Guan W. et al. VNN1 as a potential biomarker for sepsis diagnosis and its implications in immune infiltration and tumor prognosis // Frontiers in medicine 2023. 10. P. 1236484.

3. Mas-Celis F. et al. Sepsis in trauma: A deadly complication // Archives of medical research 2021. 52. P. 808–816.

4. Dzhalilova D. S. et al. Dependence of the severity of the systemic inflammatory response on resistance to hypoxia in male Wistar rats // Journal of inflammation research. 2019. 12. С. 73–86.

5. Dzhalilova D. S. et al. Morphological and Molecular Biological Features of the Systemic Inflammatory Response in Old Wistar Rats with High and Low Resistance to Hypoxia // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2023. № 5 (175). P. 704–710.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-352

МОДУЛЯЦИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА

MODULATION OF SYNAPTIC NEUROPLASTICITY USING DEVELOPMENTAL STIMULATION OF THE DORSAL HIPPOCAMPUS

Л. Е. Сорокина[1,2], И. И. Фомочкина[1], А. В. Кубышкин[1]

[1]Центральная научно-исследовательская лаборатория, Медицинская академия им. С. И. Георгиевского, Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского, Симферополь
[2]Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В. И. Кулакова Минздрава России, Москва

L. E. Sorokina[1,2], I. I. Fomochkina[1], A. V. Kubyshkin[1]

[1]Central Research Laboratory, Georgievsky Medical Academy, Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol
[2]National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov Ministry of Healthcare of Russian, Moscow

✉ leya.sorokina@mail.com

Аннотация

В работе представлены обобщающие экспериментальные данные по изучению возможностей модуляции синаптической нейропластичности в ходе оптогенетической стимуляции дорсального гиппокампа.

Abstract

This work presents generalizing experimental data on studying the possibilities of modulating synaptic neuroplasticity during optogenetic stimulation of the dorsal hippocampus.

Сегодня для современной нейробиологии одной из наиболее сложных и актуальных задач остается изучение механизмов формирования и реализации пластичности мозга [1]. Описываемая уникальная способность нервной системы является не только важнейшим фактором восстановления гомеостаза организма после травм и повреждений, но также способствует развитию когнитивных способностей и развитию социоадаптивного поведения у человека.

В последние годы значительный прогресс в изучении особенностей функционирования мозга привнесло такое инновационное направление, как оптогенетика. Методика оптогенетического подхода позволяет управлять при помощи света активностью нервных клеток, экспрессирующих особые фотоактивируемые белки [2, 3].

Представленная работа посвящена изучению эффектов оптогенетической стимуляции нейронов дорсального гиппокампа в эксперименте. Исследование проведено на 20 трансгенных мышах линии B6.Cg-Tg (Thy1-COP4/EYFP) 18Gfng/J, которые были рандомизированы в две группы: экспериментальная (n = 10) и контрольная (n = 10).

Операция по установке волоконно-оптического нейроинтерфейса в область дорсального гиппокампа животных проводилась с использованием технологий стереотаксического внедрения (стереотаксический аппарат Drill Robot, Германия). К канюле мыши на время свечения подсоединялся LED-драйвер в составе экспериментальной установки, который использовался в триггерном режиме. Основным узлом в экспериментальной установке являлся источник света — светодиодный лазер (Thor Labs, США), который излучает свет (длина волны 470 нм) для активации генетически внедренного светочувствительного белка-каналродопсин-2 (ChR2). Исходя из кинетики ChR2, была выбрана частота свечения, равная 33 Гц, со скважностью 16 %, модулируемым генератором. Выходная мощность лазера варьировала от 17,2 до 21,9 Вт. Для доставки света от излучателя к мыши использовали волоконно-оптический кабель.

В ходе ряда проведенных экспериментов был выбран оптимальный импульсный режим свечения («on — off»): 5 мс в режиме «on» и 25 мс в режиме «off» на протяжении 2,5 мин с интервалами отдыха 4,5 мин в 3 подхода, общей продолжительностью свечения 21 мин/день на протяжении 8 недель ежедневно.

Для оценки нейрохимических аспектов нейропластичности использовались молекулярно-генетические, морфологические методы исследования и поведенческие тесты. При выполнении иммуноферментного анализа

© Л. Е. Сорокина, И. И. Фомочкина, А. В. Кубышкин, 2024

образцов в группе экспериментальных животных, подвергнутых оптической стимуляции, наблюдалось статистически значимое увеличение концентрации GDNF ($p = 0,004$) и EAAT ($p = 0,03$) по сравнению со значениями группы контроля. В отношении TGF-a. Морфологически в группе экспериментальных животных наблюдается повышение плотности дорсального гиппокампа. В теменной коре у нейронов выявлены признаки повышенной активности в виде усиления белковой синтетической функции: инвагинации плазмолеммы, увеличения числа ядрышек, расширения перинуклеарного пространства, переходящего в гранулярную эндоплазматическую сеть, увеличения количества полисом и рибосом. Также получены данные об увеличении количества миелинизированных отростков и дендритных связей, что свидетельствует об активации пластичности мозга и синапсообразования. По результатам поведенческого теста Fear Conditioning было установлено, что оптостимуляция зоны дорсального гиппокампа приводит к улучшению когнитивных функций мышей экспериментальной группы. Продолжительность замирания указанных животных на этапе «до условного стимула» и «после условного стимула» значительно различалась на финальный день эксперимента по сравнению с группой контроля ($p = 0,001$). Также в экспериментальной группе наблюдалось увеличение скорости достижения цели в тесте Барнса по сравнению с контрольной группой на 22 % и сокращение длины трека на 28 %.

Полученные в ходе эксперимента подтверждения нейро- и синаптогенеза позволяют в дальнейших экспериментах расширять линейку поведенческих скрининговых тестов, а также изучить эффективность предлагаемого подхода у животных с моделями прогрессирующих нейродегенеративных заболеваний, приводящих к ослаблению когнитивных функций.

Литература

1. Храмова М. В., Храмов А. Е., Федоров А. А. Современные тренды развития нейронаучных исследований в образовании // Вопросы образования. 2023. Т. 4. С. 275–316.

2. Losi A., Gardner K. H., Möglich A. Blue-Light Receptors for Optogenetics // Chemical Rev. 2018. Vol. 118(21). P. 10659–10709.

3. Deubner J., Coulon P., Diester I. Optogenetic approaches to study the mammalian brain // Curr. Opin. Structur. Biol. 2019. Vol. 57. P. 157–163.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-353

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ НЕ ВЛИЯЮТ НА АТЕРОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ *

EXTRACELLULAR VESICLES DO NOT AFFECT THE ATHEROGENIC PROPERTIES OF LOW-DENSITY LIPOPROTEINS

Р. С. Суркова[1,3], Е. А. Марасаева[1], И. А. Собенин[1,2], А. Н. Орехов[1,3]

[1]Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва
[2]Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии им. акад. В. Н. Смирнова, Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е. И. Чазова МЗ РФ, Москва
[3]Научно-исследовательский институт атеросклероза, Москва

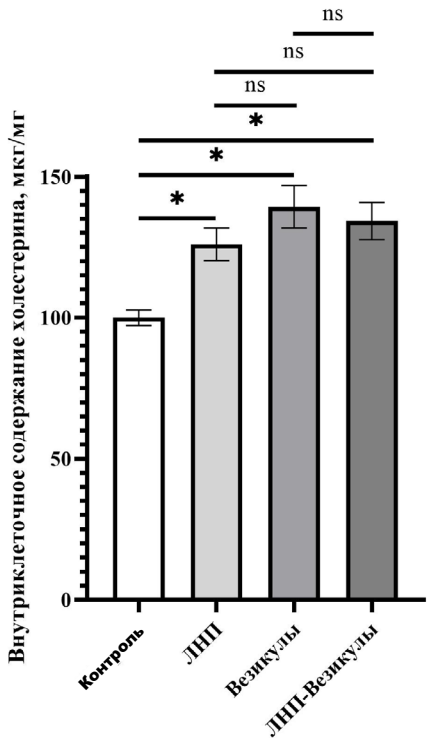
R. S. Surkova[1,3], E. A. Marasaeva[1], I. A. Sobenin[1,2], A. N. Orekhov[1,3]

[1]Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow
[2]Smirnov Institute of Experimental Cardiology, Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow
[3]Scientific Research Institute for Atherosclerosis Research, Moscow

✉ raisasurkova850@gmail.com

Аннотация

Были выделены везикулы из сыворотки крови человека и проведена инкубация полученных везикул с культурами клеток линии THP-1 в присутствии липопротеидов низкой плотности (ЛНП). Показано, что добавление везикул к ЛНП при инкубации с клеточными культурами не приводит к изменению атерогенных свойств ЛНП.



Влияние ЛНП и внеклеточных везикул на способность культивируемых клеток THP-1 накапливать холестерин

Abstract

Vesicles were isolated from human blood serum and the resulting vesicles were incubated with THP-1 cell cultures in the presence of LDL. It has been shown that the addition of vesicles to LDL during incubation with cell cultures does not lead to a change in the atherogenic properties of LDL.

В крови человека могут циркулировать белки, обладающие нейраминидазной (сиалидазной) активностью, т. е. способные отщеплять остатки сиаловых кислот от биантенных полисахаридных цепей протеогликанов [1]. Десиалирование нативных липопротеидов низкой плотности (ЛНП) приводит к приобретению атерогенных свойств [2]. Неясно, каким образом известные внутриклеточные нейраминидазы могут попадать в кровоток и проявлять ферментативную активность. Ранее нами было установлено, что везикулы обладают сиалидазной активностью, т. е. могут переносить белки, способные отщеплять сиаловые кислоты от ЛНП.

Целью нашей работы было исследовать влияние внеклеточных везикул на атерогенные свойства ЛНП.

Сыворотки крови больных ишемической болезнью сердца использовали в качестве биологического материала для получения везикул. Образцы сыворотки крови от больных ИБС были взяты из лаборатории клинической биохимии (отделение клинической кардиологии ФГБУ «НМИЦ кардиологии», Москва) как неутилизированные остатки после проведения рутинных биохимических исследований. Везикулы из сыворотки крови выделяли с помощью 6%-го раствора PEG6000.

Для оценки способности везикул и ЛНП индуцировать внутриклеточное накопление холестерина использовали культуру клеток

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-65-00005).
© Р. С. Суркова, Е. А. Марасаева, И. А. Собенин, А. Н. Орехов, 2024

THP-1. Клетки инкубировали с везикулами (50 мкг/мл по белку) и ЛНП (100 мкг/мл по белку) в течение 24 ч, экстрагировали внутриклеточные липиды и измеряли содержание внутриклеточного холестерина, как описано в [3]. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ IBM SPSS Statistics 23 с использованием критерия Манна — Уитни. Уровень значимости был принят за 0,05.

Инкубация везикул с клеточными культурами приводила к статистически значимому повышению содержания холестерина (см. рисунок) по сравнению с контролем (клетки без добавления веществ), что позволяет предположить, что везикулы обладают атерогенными свойствами. ЛНП были способны вызывать статистически значимое внутриклеточное накопление холестерина при инкубации с клетками, т. е. были атерогенными.

При инкубации культивируемых клеток с ЛНП и везикулами наблюдали статистически значимое повышение содержания холестерина по сравнению с контролем. При сравнении внутриклеточного содержания холестерина после инкубации везикул и ЛНП с клеточными культурами и инкубации клеток с везикулами не было отмечено статистически значимого накопления холестерина.

Таким образом, внеклеточные везикулы не оказывают влияния на атерогенные свойства ЛНП.

Литература

1. Glanz V., Bezsonov E. E., Soldatov V. et al. Thirty-five-year history of desialylated lipoproteins discovered by Vladimir Tertov // Biomedicines. 2022. Vol. 10(5). P. 1174. DOI: 10.3390/biomedicines10051174.

2. Minami A., Kurebayashi Y., Takahashi T. et al. The function of sialidase revealed by sialidase activity imaging probe // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22(6). P. 3187. DOI: 10.3390/ijms22063187.

3. Markin A. M., Markina Y. V., Bogatyreva A. I. et al. The role of cytokines in cholesterol accumulation in cells and atherosclerosis progression // Int. J. Mol. Sci. 2023. Vol. 24(7). P. 6426. DOI: 10.3390/ijms24076426.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-354

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА У РАБОТНИКОВ ОБЪЕКТОВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION MORBIDITY AMONG WORKERS OF NUCLEAR POWER FACILITIES

А. Р. Тахауов, Л. Р. Тахауова, Л. В. Смаглий, Д. Е. Калинкин

Северский биофизический научный центр ФМБА России

A. R. Takhauov, L. R. Takhauova, L. V. Smagliy, D. E. Kalinkin

Seversk Biophysical Research Center FMBA

✉ anas.t@inbox.ru

Аннотация

Болезни системы кровообращения (БСК) — главная причина смерти в индустриально развитых странах [1, 2]. Роль техногенных факторов в развитии коронарных катастроф изучена недостаточно. Расширение использования ионизирующего излучения (ИИ) в различных сферах человеческой деятельности породило вопросы о влиянии техногенного облучения на риск заболеваемости БСК [2–4].

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death in industrially developed countries [1, 2]. The role of technogenic factors in the development of coronary catastrophes is not sufficiently studied. The expansion of the use of ionizing radiation (IR) in various spheres of human activity has raised questions about the impact of technogenic radiation on the risk of CVD morbidity [2–4].

Цель исследования — оценка заболеваемости острого инфаркта миокарда (ОИМ) у людей, подвергавшихся профессиональному техногенному облучению, на основании ретроспективного когортного исследования.

Материалы и методы

Наблюдение проводилось в период 1995–2017 гг. Исследуемая группа включала в себя работников объектов использования атомной энергии (ОИАЭ), которые были приняты на работу в период с 01.01.1950 по 31.12.2000 и проработали на предприятии не менее 3 лет.

Информация об остром коронарном синдроме среди работников ОИАЭ старше 20 лет собиралась в соответствии с программой «Регистр ОИМ», созданной Всемирной организацией здравоохранения в 1968 г.

Диагноз «острый инфаркт миокарда» (коды по МКБ-10 I 21.0-I 21.4) был верифицирован у 6556 человек (2717 женщин и 3839 мужчин).

Для работников без ОИМ конечной датой наблюдения являлась дата окончания периода наблюдения (31.12.2017), для умерших — дата смерти, для лиц с ОИМ — дата установления диагноза заболевания, для уехавших из города — дата последнего уточнения жизненного статуса.

Результаты

При оценке развития ОИМ среди лиц, подвергавшихся долговременному техногенному профессиональному сочетанному воздействию радиационных факторор (γ-излучение и α-излучение ^{239}Pu), зарегистрировано повышение заболеваемости ОИМ по сравнению с показателями заболеваемости у персонала вспомогательного производства, не подвергавшимися техногенному облучению.

В ходе исследования было отмечено, что сочетанное облучение сопровождалось повышением заболеваемости ОИМ в период 1995–2017 гг. как у лиц трудоспособного возраста (в возрастных группах 20–49 лет), так и у мужчин старшей возрастной группы (80–84 года).

Выявлено, что заболеваемость ОИМ в когорте работников ОИАЭ, нанятых в период 1950–1994 гг. и наблюдавшихся в период 1995–2017 гг., увеличивается по мере роста суммарной дозы внешнего облучения (СДВО), что подтверждается регрессионным анализом зависимости «доза — эффект» для заболеваемости ОИМ. Возрастание заболеваемости ОИМ становится статистически значимым с уровня 100 мГр.

© А. Р. Тахауов, Л. Р. Тахауова, Л. В. Смаглий, Д. Е. Калинкин, 2024

Заключение

В проведенном исследовании анализ заболеваемости по возрастным группам для персонала ОИАЭ показал повышение заболеваемости ОИМ как у мужчин трудоспособного возраста (20–49 лет), так и у мужчин старшей возрастной группы (80–84 года) при сочетанном профессиональном техногенном облучении.

У работников изучаемой когорты была выявлена статистически значимая тенденция увеличения заболеваемости ОИМ по мере роста СДВО без учета нерадиационных факторов в период 1995–2017 гг., что может быть связано с дисфункцией эндотелия артерий и артериол вследствие воздействия ИИ.

Литература

1. Попова Н. М., Бушманов А. В. Смертность от болезней системы кровообращения // Синергия наук. 2019. № 31. С. 1382–1390.

2. Вишневский А. Г. и др. Смертность от болезней системы кровообращения и продолжительность жизни в России // Демографическое обозрение. 2016. Т. 3. № 1. С. 6–34.

3. Оганов Р. Г., Масленникова Г. Я. Стратегии профилактики сердечно-сосудистых заболеваний в Российской Федерации // Клиническая медицина. 2012. Т. 90. № 3. С. 4–7.

4. Калинкин Д. Е. и др. Анализ заболеваемости взрослого населения, проживающего в зоне действия предприятия атомной индустрии // Социальные аспекты здоровья населения. 2022. Т. 68. № 5. DOI: 10.21045/2071-5021-2022- 68-5-7 (URL: http://vestnik.mednet.ru/content/view/1417/30/lang,ru/).

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-355

УСИЛЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЙСЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В СОСТАВЕ ПОЛИЭПИТОПНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА *

ENHANCEMENT OF IMMUNOGENIC PROPERTIES BY USING SPACER SEQUENCES AS PART OF POLYEPITOPE T-CELL IMMUNOGENS OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

Е. В. Тигеева, Е. В. Шабурова, Д. Н. Кисаков, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, В. А. Яковлев, Л. А. Кисакова, Н. Б. Рудометова, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко

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

E. V. Tigeeva, E. V. Shaburova, D. N. Kisakov, M. B. Borgoyakova, E. V. Starostina, V. A. Yakovlev, L. A. Kisakova, N. B. Rudometova, A. P. Rudometov, L. I. Karpenko

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

✉ lena.tigeeva@gmail.com

Аннотация

В работе представлены результаты сравнительного исследования двух Т-клеточных полиэпитопных иммуногенов AG1 и AG4, кодирующих цитотоксические и Т-хэлперные эпитопы из белков NS1, NS3, NS5 и E вируса клещевого энцефалита. Показано, что включение аланиновых спейсеров в конструкцию AG1, спроектированную с помощью PolyCTLDesigner, позволило повысить ее иммуногенность.

Abstract

This work provides the results of a comparative study of two T-cell polyepitope immunogens AG1 and AG4 encoding cytotoxic and T-helper epitopes from NS1, NS3, NS5 and E proteins of tick-borne encephalitis virus. The integration of alanine spacers into the AG1 construct designed with PolyCTLDesigner was shown to increase its immunogenicity.

Лицензированные вакцины против вируса клещевого энцефалита (КЭ) на основе инактивированного вируса нацелены на активацию В-клеточного ответа против вируса. Несмотря на высокую иммуногенность и эффективность, недостатком таких вакцин является необходимость постоянной ревакцинации в целях поддержания защитного иммунитета. Одной из причин этого явления может быть недостаточное разнообразие реакций Т-клеточного иммунного ответа.

В последние годы концепция создания искусственных полиэпитопных иммуногенов все чаще применяется при разработке вакцин против различных вирусных инфекций. Полиэпитопные иммуногены представляют собой относительно новую технологию создания вакцин, основанную на применении современных методов рационального дизайна при конструировании последовательностей, включающих иммунодоминантные Т-клеточные эпитопы. Такой подход позволяет добиться высокоспецифичного Т-клеточного иммунного ответа на тот или иной антиген.

На данный момент вопрос о влиянии на иммуногенность искусственных антигенов различных факторов остается малоизученным. Так, одной из проблем дизайна полиэпитопных вакцин является подбор линкеров, соединяющих разные пептиды друг с другом.

Целью данной работы стало сравнительное исследование двух экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопные иммуногены AG1 и AG4.

Ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были спроектированы Т-клеточные полиэпитопные иммуногены AG1 и AG4, включающие Т-клеточные эпитопы вируса КЭ, в состав которых входят цитотоксические и Т-хэлперные эпитопы из белков NS1, NS3, NS5 и E ВКЭ. При дизайне AG1 были использованы аланиновый спейсеры, которые подбирались на основе данных программы PolyCTLDesigner. Выбор последовательности был обусловлен тем, что наличие аланина на N-конце спейсера благоприятно сказывается на процессинге фрагмента иммунопротеазами. Для AG4 спейсеры были полностью исключены из конструкции иммуногена. Полученные

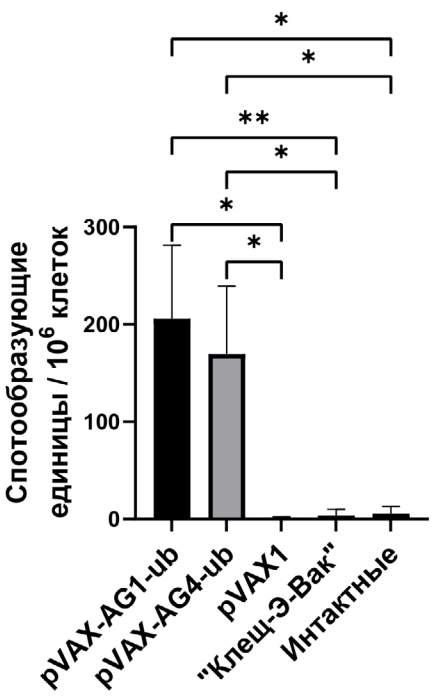
* Исследование было выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© Е. В. Тигеева, Е. В. Шабурова, Д. Н. Кисаков, М. Б. Боргоякова, Е. В. Старостина, В. А. Яковлев, Л. А. Кисакова, Н. Б. Рудометова, А. П. Рудометов, Л. И. Карпенко, 2024

конструкции были клонированы в составе плазмидного вектора pVAX1, соответствующие плазмиды были названы pVAX-AG1-ub и pVAX-AG4-ub.

Для оценки иммуногенности полученных ДНК-вакцинных конструкций проводили иммунизацию мышей линии BALB/c. Иммунизацию мышей проводили дважды на 0 и 21 дни. Первой группе животных вводили в/м 100 мкг плазмиды pVAX-AG1-ub в 50 мкл PBS с последующей электропорацией; второй группе животных вводили в/м 100 мкг плазмиды pVAX-AG4-ub в 50 мкл PBS с последующей электропорацией; третьей группе — 100 мкг pVAX1 в 50 мкл PBS с последующей электропорацией; четвертой группе вводили внутрибрюшинно 0,5 мл вакцины Клещ-Э-Вак (ФГУП «ПИПВЭ им. М. П. Чумакова» РАМН). Эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (номер разрешения: ГНЦ ВБ «Вектор»/02-03.2023, Протокол БЭК № 2 от 03.04.2023).

Анализ Т-клеточного иммунного ответа с помощью метода IFN-γ-ELISpot проводили на 14 сутки после второй иммунизации. В контрольных группах животных, иммунизированных вакциной «Клещ-Э-Вак» и pVAX1, клеточный ответ был на уровне фона (см. рисунок). Было показано, что наибольшее количество спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на специфическую стимуляцию пулом пептидов из белков ВКЭ, зарегистрировано в группе мышей, иммунизированных pVAX-AG1-ub, по сравнению с группой, иммунизированной pVAX-AG4-ub. Хотя такое различие не является статистически достоверным, подобная тенденция сохранялась в повторных экспериментах.



Количество спленоцитов, экспрессирующих IFNγ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определенное методом ELISpot. Различия между группами определяли с использованием непараметрического критерия Краскела — Уоллеса (P-value ** — 0,01)

Таким образом, полученные ДНК-вакцинные конструкции pVAX-AG4-ub и pVAX-AG1-ub индуцируют формирование вирус-специфического Т-клеточного ответа. При этом pVAX-AG1-ub индуцирует более высокий уровень Т-клеточного ответа, чем pVAX-AG4-ub. Включение аланиновых спейсеров в конструкции AG1, спроектированную с помощью PolyCTLDesigner, позволило повысить ее иммуногенность, по-видимому, за счет лучшего процессинга и презентации эпитопов.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-356

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОМЕРИЗОВАННОЙ ФОРМЫ B-АМИЛОИДА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ СИМПТОМОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

THE MODELING OF ALZHEIMER'S DISEASE SYMPTOMS USING THE ISOMERIZED FORM OF B-AMYLOID

В. М. Ушакова[1,2], Я. А. Зоркина[1], О. В. Абрамова[1], Е. П. Барыкин[3], Е. А. Зубков[1], А. Г. Очнева[1], М. П. Валихов[1], А. Н. Ванеев[4], В. А. Митькевич[3], О. И. Гурина[1], В. П. Чехонин[1], А. Ю. Морозова[1]

[1]Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В. П. Сербского Минздрава России, Москва
[2]Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
[3]Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва
[4]Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

V. M. Ushakova[1,2], Ya. A. Zorkina[1], O. V. Abramova[1], E. P. Barykin[3], E. A. Zubkov[1], A. G. Ochneva[1], M. P. Valikhov[1], A. N. Vaneev[4], V. A. Mitkevich[3], O. I. Gurina[1], V. P. Chekhonin[1], A. Yu. Morozova[1]

[1]Serbsky National Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology, Moscow
[2]Lomonosov Moscow State University
[3]Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow
[4]MISIS University of Science and Technologies, Moscow

✉ ushakovavm@yandex.ru

Аннотация

Патогенез болезни Альцгеймера тесно связан с накоплением β-амилоида. Химические модификации белка, такие как изомеризация, увеличивают его патогенность. В нашей работе мы оценили эффекты стереотаксического введения изомеризованной формы β-амилоида. Введение белка индуцировало симптомы, характерные для болезни Альцгеймера и привело к увеличению окислительного стресса в головном мозге крыс.

Abstract

The pathogenesis of Alzheimer's disease is closely related to the accumulation of β-amyloid. Chemical modifications of the protein, such as isomerization, increase its pathogenicity. In our research, we evaluated the effects of stereotactic administration of an isomerized form of β-amyloid. The protein injection induced symptoms of Alzheimer's disease and increased an oxidative stress in the rat brain.

Болезнь Альцгеймера поражает около 27 миллионов человек по всему миру, являясь наиболее распространенной формой деменции [1]. Осложняет проблему отсутствие эффективной терапии заболевания, которая на текущий момент, главным образом, оказывает симптоматическое лечение [2].

Одними из основных механизмов развития патологии считаются накопление бляшек β-амилоида и фосфорилирование тау-белка. Сенильные бляшки и растворимые олигомеры амилоида содержат множество модифицированных форм белка. Наиболее распространенной формой модификации является изомеризация по 7 остатку аспаргиновой кислоты [3]. Показано, что изомеризация амилоида усиливает нейротоксичность, оказывает негативное влияние на нейрональные рецепторы, индуцирует фосфорилирование тау *in vitro* и амилоидогенез *in vivo* [3, 4]. Ввиду этого целью нашей работы стала оценка возможности индукции признаков болезни Альцгеймера у лабораторных крыс после стереотактического введения олигомеров изомеризованной формы β-амилоида в желудочки головного мозга.

В работе были использованы 24 самца крыс линии Wistar возрастом около 2 месяцев. Животные были разделены на группу контроля (ложнооперированные животные), группу, подвергавшуюся введению олигомеров β-амилоида, и группу, подвергавшуюся введению олигомеров изомеризованной формы β-амилоида. Оптимальные сроки инкубации и температурный режим (4 °C, 24 ч) для получения необходимой формы белка были выбраны при помощи атомно-силового микроскопа. Стереотаксическое введение раствора в желудочки головного мозга крыс осуществлялось по следующим координатам: AP:-1; ML:±1,5; DV:-4,3. Для оценки влияния β-амилоида

© В. М. Ушакова, Я. А. Зоркина, О. В. Абрамова, Е. П. Барыкин, Е. А. Зубков, А. Г. Очнева, М. П. Валихов, А. Н. Ванеев, В. А. Митькевич, О. И. Гурина, В. П. Чехонин, А. Ю. Морозова, 2024

на когнитивные функции крыс был проведен тест «Водный лабиринт Морриса». Измерение уровня окислительного стресса в гиппокампе и фронтальной коре крыс проводилось методом электрохимического интравитального анализа с использованием платиновых наноэлектродов. Накопление амилоидных бляшек в тканях головного мозга крыс было оценено методом иммуногистохимического анализа. Статистический анализ полученных данных проводился в программе jamovi (версия 2.3.21).

По результатам исследования были выявлены когнитивные нарушения у крыс, подвергавшихся стереотаксическому введению β-амилоида. В частности, было показано значимое увеличение времени поиска платформы у группы изо-амилоида по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), а также снижение длительности нахождения в отсеке, где ранее располагалась платформа, у группы, которой вводили немодифицированную форму белка. Кроме того, в обеих экспериментальных группах был статистически значимо снижен процент успешных попыток при обучении ($p < 0,05$). Оценка уровня окислительного стресса в структурах головного мозга крыс выявила различия только у группы, которой вводилась изомеризованная форма β-амилоида ($p < 0,05$). Иммуногистохимическое исследование срезов головного мозга животных выявило накопление β-амилоида в тканях мозга в обеих экспериментальных группах.

Таким образом, стереотаксическое введение патогенного белка в желудочки головного мозга животных индуцировало симптомы, характерные для болезни Альцгеймера: снижение когнитивных функций, накопление β-амилоида, а также повышение уровня окислительного стресса [2]. Тем не менее выраженные различия между формами белка были получены лишь при оценке окислительного стресса. Дальнейшая работа должна быть направлена на углубление поведенческого анализа, а также на более подробное изучение эффектов введения изомеризованной формы белка.

Литература

1. Silva M. V. F., Loures C. M. G., Alves L. C. V., de Souza L. C., Borges K. B. G., Carvalho M. D. G. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures // Journal of biomedical science. 2019. Vol. 26(1). P. 33.

2. Breijyeh Z., Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment // Molecules. 2020. Vol. 25. P. 5789.

3. Barykin E. P., Garifulina A. I., Kruykova E. V., Spirova E. N., Anashkina A. A., Adzhubei A. A., Shelukhina I. V., Kasheverov I. E., Mitkevich V. A., Kozin S. A., Hollmann M., Tsetlin V. I., Makarov A. A. Isomerization of Asp7 in Beta-Amyloid Enhances Inhibition of the α7 Nicotinic Receptor and Promotes Neurotoxicity // Cells. 2019. Vol. 8(8). P. 771.

4. Kozin S. A., Barykin E. P., Telegin G. B., Chernov A. S., Adzhubei A. A., Radko S. P., Mitkevich V. A., Makarov A. A. Intravenously Injected Amyloid-β Peptide With Isomerized Asp7 and Phosphorylated Ser8 Residues Inhibits Cerebral β-Amyloidosis in AβPP/PS1 Transgenic Mice Model of Alzheimer's Disease // Frontiers in Neuroscience. 2018. Vol. 12. P. 518.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-357

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ CAR Т-КЛЕТОК *IN VITRO* И *IN VIVO* *

ANTITUMOR ACTIVITY AND PHENOTYPIC PROPERTIES OF GD2-SPECIFIC CAR T CELLS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Ю. Г. Филиппова[1], Ю. А. Шевченко[1], М. С. Фишер[1], С. Алрхмун[1], Р. Ю. Перик-Заводский[1], О. Ю. Перик-Заводская[1], Ю. А. Лопатникова[1], В. В. Курилин[1], М. О. Волынец[1], А. Алсаллум[1], Е. Л. Завьялов[2], О. И. Соловьева[2], Х. Шику[3], А. Н. Силков[1], С. В. Сенников[1]

[1]*Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск*
[2]*Центр коллективного пользования SPF-виварий ИЦиГ СО РАН, Новосибирск*
[3]*Университет Мие, Цу, Япония*

J. G. Philippova[1], J. A. Shevchenko[1], M. S. Fisher[1], S. Alrhmoun[1], R. Yu. Perik-Zavodskii[1], O. Yu. Perik-Zavosdkaia[1], J. A. Lopatnikova[1], V. V. Kurilin[1], M. O. Volynets[1], A. Alsalloum[1], E. L. Zavjalov[2], O. I. Solovjeva[2], H. Shiku[3], A. N. Silkov[1], S. V. Sennikov[1]

[1]*Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk*
[2]*Center for Collective Use SPF-vivarium ICG SB RAS, Novosibirsk*
[3]*Mie University, Tsu, Japan*

✉ airyuka@mail.ru

Аннотация

В данной работе методом ретровирусной трансдукции были получены антиген-специфические Т-клетки, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор (CAR), нацеленный на дисиалоганглиозид (GD2), и GITR лиганд (GITRL). Полученные GD2-специфические CAR Т-клетки демонстрируют противоопухолевую активность и антиген-специфические свойства *in vitro* и *in vivo* в отношении $GD2^+$ опухолевых клеточных линий.

Abstract

In this study antigen-specific T cells expressing chimeric antigen receptor (CAR) targeting disialoganglioside (GD2) and GITR ligand were generated using retroviral transduction. The generated GD2-specific CAR T cells exhibited antitumor activity and antigen-specific properties *in vitro* and *in vivo* against $GD2^+$ tumor cell lines.

Адаптивный перенос *ex vivo* генерируемых генно-модифицированных Т-клеток представляет собой перспективный метод иммунотерапии онкологических заболеваний. Особенностью CAR Т-клеток является специфическое нацеливание на поверхностные антигены, а встраиваемый костимулирующий домен CD28 в конструкцию CAR способствует активации клеток при встрече с мишенью без предварительной антигенной презентации [1]. Среди большого разнообразия антигенов молекула GD2 стабильно экспрессируется на клеточной поверхности различных типов опухолевых клеток, при этом экспрессия антигена в основном ограничена злокачественными новообразованиями, что делает эту мишень привлекательной для нацеливания с помощью CAR-рецептора [2].

Противоопухолевый потенциал готового CAR Т-клеточного продукта задействует различные механизмы иммунной системы для усиления защитных функций, однако микроокружение опухоли и приобретение статуса истощения Т-клетками затрудняют терапию солидных образований. В данном исследовании для повышения противоопухолевой эффективности GD2-специфичных CAR Т-клеток в ретровирусный вектор дополнительно была встроена последовательность, кодирующая GITRL. Аутокринное воздействие на GITR-рецептор CAR Т-клеток с помощью растворимой формы GITRL может способствовать усилению пролиферации и продукции цитокинов и снижению порога CD28-костимуляции и апоптоза эффекторных $CD8^+$ Т-клеток [3, 4].

Целью работы является оценка противоопухолевой активности и фенотипических свойств GD2-специфичных CAR Т-клеток, экспрессирующих GITRL, *in vitro* и *in vivo*.

В данной работе Т-лимфоциты человека, выделенные из периферической крови условно-здоровых доноров, были модифицированы путем трансдукции ретровирусными векторами, кодирующими GD2-специфичный

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 21-65-00004).

© Ю. Г. Филиппова, Ю. А. Шевченко, М. С. Фишер, С. Алрхмун, Р. Ю. Перик-Заводский, О. Ю. Перик-Заводская, Ю. А. Лопатникова, В. В. Курилин, М. О. Волынец, А. Алсаллу, Е. Л. Завьялов, О. И. Соловьева, Х. Шику, А. Н. Силков, С. В. Сенников, 2024

CAR-рецептор. После трансдукции было проведено транскриптомное профилирование с помощью платформы NanoString и фенотипическое исследование полученных субпопуляций GD2-специфичных CAR Т-клеток методом проточной цитометрии. Трансдуцированные клетки совместно культивировались с опухолевыми клетками (линии меланомы: $GD2^+$ — SK-MEL-37 и S6; $GD2^-$ — V9) для оценки противоопухолевой активности и фенотипа *in vitro* методами проточной цитометрии и измерения содержания лактатдегидрогеназы и продукции цитокинов в кондиционных средах. Противоопухолевая эффективность GD2-специфичных CAR Т-клеток *in vivo* оценивалась на мышиных моделях ксенотрансплантата опухолей человека.

В ходе исследования было выявлено, что трансдуцированные Т-клетки обладают выраженной антиген-специфической цитотоксичностью против клеток-мишеней и по сравнению с нетрансдуцированными клетками достоверно больше секретируют IFN-γ, растворимую форму sFasL, гранзимы A/B. Популяция GD2-специфичных CAR Т-клеток имеет фенотип наивных $CD45RA^+CD62L^+$ клеток, среди которых преобладают цитотоксические $CD8^+CD40L^+CD69^-CD107a^+4\text{-}1BB^+FasL^+$ Т-клетки с низкой экспрессией маркеров истощения TIM-3 и PD-1. Транскриптомное профилирование показало, что после трансдукции повышается экспрессия генов (*CD8A*, *CD8B*, *SELL*, *IL7R*, *CD45RA* и *IL2RG*), ассоциированных с дифференцировкой в сторону наивных CD8 Т-клеток, и, напротив, снижается экспрессия генов (*CD4*, *FOXP3*, *IL2RA* и *CTLA4-TM*), ассоциированных с дифференцировкой в сторону CD4 Т-регуляторных клеток. В модели ксенотрансплантата опухоли человека GD2-специфичные CAR Т-клетки демонстрируют стойкий противоопухолевый эффект, который выражается подавлением роста трансплантированной опухоли.

Таким образом, полученные GD2-специфические CAR Т-клетки проявляют антиген-специфические свойства, обладают мощным противоопухолевым потенциалом *in vitro* посредством регулирования цитотоксической оси гранзимов A и B, высвобождения провоспалительных цитокинов и индукции оси апоптоза Fas/FasL, и эффективно подавляют рост опухоли *in vivo*.

Литература

1. Krause A., Guo H. F., Latouche J. B. et al. Antigen-dependent CD28 signaling selectively enhances survival and proliferation in genetically modified activated human primary T lymphocytes // The Journal of experimental medicine. 1998. Vol. 188(4). P. 619–626.

2. Philippova J., Shevchenko J., Sennikov S. GD2-targeting therapy: a comparative analysis of approaches and promising directions // Frontiers in immunology. 2024. Vol. 15, 1371345.

3. Tian J., Zhang B., Rui K., et al. The Role of GITR/GITRL Interaction in Autoimmune Diseases // Frontiers in immunology. 2020. Vol. 11, 588682.

4. Филиппова Ю. Г., Кузнецова М. С., Шевченко Ю. А. и др. Фенотип и эффекторные функции GD2-специфичных CAR-Т-клеток in vitro // Иммунология. 2022. Т. 43(5). С. 525–535.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-358

ИНДУКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ТОЛЕРОГЕННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ *

INDUCTION OF IMMUNOLOGICAL TOLERANCE USING TOLERANT DENDRITIC CELLS IN EXPERIMENTAL ARTHRITIS

М. С. Фишер, В. В. Курилин, С. В. Сенников

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск

M. S. Fisher, V. V. Kurilin, S. V. Sennikov

Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk

✉ msolshanova@gmail.com

Аннотация

Восстановление иммунологической толерантности с помощью толерогенных дендритных клеток (толДК) является перспективным направлением в терапии аутоиммунных заболеваний. В нашем исследовании мы проанализировали эффективность использования дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, для индукции иммунологической толерантности в экспериментальной модели артрита.

Abstract

Restoration of immunological tolerance with the help of tolerant dendritic cells (tolDC) is a promising direction in the treatment of autoimmune diseases. In our study, we analyzed the effectiveness of using dendritic cells transfected with DNA constructs to induce immunological tolerance in an experimental model of arthritis.

Активно развивающийся подход с применением толерогенных дендритных клеток (толДК), он является одним из методов восстановления иммунологической толерантности. Неспецифические толДК обладают потенциалом подавлять функциональную активность не только аутореактивных Т-клеток, но и других иммунных клеток. Это может привести к риску возникновения инфекционных и онкологических заболеваний, нефро- и гепатотоксичности. При производстве антиген-специфических дендритных клеток (ДК) встает проблема выбора антигенов для нагрузки, т. к. в патогенезе аутоиммунных заболеваний участвует несколько аутоантигенов, и толерантность только к одному из них может не привести к эффекту. Возможно, одновременное использование нескольких аутоантигенов или трансфекция экзогенной ДНК, кодирующей несколько пептидов, решит эту проблему. Важным аспектом является сохранение устойчивого толерогенного фенотипа ДК. Одним из хемокинов, который может одновременно влиять на миграцию и сохранение толерогенного фенотипа ДК, является CCR9. В нашем исследовании мы использовали ДНК-конструкции, кодирующие IL-10 и CCR9 для создания толДК с более устойчивым толерогенным фенотипом, и коллаген II типа для получения антиген-специфических клеток.

Цель: оценить эффективность применения дендритных клеток, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, коллаген II типа и CCR9, для индукции иммунологической толерантности в экспериментальной модели артрита.

Материалы и методы

ДК были получены из клеток костного мозга мышей линии Balb/c и культивировались при добавлении IL-4 и GM-CSF. Через 5–7 суток ДК подвергались трансфекции методом электропорации при использовании следующих плазмид: pmaxCCR9, pmaxIL-10 и pmaxКоллаген типа II. Через 24 часа после трансфекции фенотип и функции ДК были изучены с помощью иммуноферментного анализа и проточной цитометрии. Миграцию электропорированных ДК оценивали *in vitro*. Индукцию антиген-коллаген индуцированного артрита (АКИА) проводили в соответствии с протоколом у мышей Balb/c. Затем мышам с АКИА вводили ДК. Развитие артрита отслеживали, измеряя припухлость лап с помощью штангенциркуля в разные моменты времени. Иммунологи-

* Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета для выполнения государственного задания на научно-исследовательскую работу «Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфоидных и стволовых клеток и/или продуктов их секретома» (№ 122011800324-4).

© М. С. Фишер, В. В. Курилин, С. В. Сенников, 2024

ческие изменения оценивали путем анализа содержания антител к коллагену II типа с помощью иммуноферментного анализа. Дополнительно было проведено гистологическое исследование тканей суставов с последующим анализом данных.

Результаты и обсуждение

В результате мы получили дендритные клетки, которые характеризовались сниженной экспрессией молекул CD80, CD86 и H-2dB (MHC класса I), но при этом повышенной экспрессией CCR9. Эти клетки также продуцировали IL-10 и обладали миграционной активностью к клеткам тимуса. Трансфицированные ДК индуцировали Т-регуляторные клетки и повышали внутриклеточное содержание IL-10 и TGF-β в $CD4^+$Т-клетках в их совместной культуре. Кроме того, толДК подавляли пролиферативную активность $CD4^+$Т-клеток в ответ на антиген. Введение ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими IL-10, CCR9 и эпитопы коллагена II типа мышам с АКИА приводило к достоверному уменьшению припухлости лап, снижению уровня антител к коллагену II типа и регрессу гистологических изменений.

Выводы

Таким образом, наше исследование демонстрирует, что использование ДК, трансфицированных ДНК-конструкциями, кодирующими эпитопы коллагена II типа, IL-10 и CCR9, способствует развитию иммунологической толерантности, что, в свою очередь, помогает контролировать воспаление и снижать тяжесть экспериментального артрита.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-359

СРАВНЕНИЕ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ КОЛЛАГЕНА И ФИБРИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ КИСТ СПИННОГО МОЗГА*

COMPARISON OF BIOENGINEER CONSTRUCTS BASED ON HYDROGELS OF COLLAGEN AND FIBRIN FOR THE TREATMENT OF CYSTS OF THE SPINAL CORD

Г. А. Фурса[1,2], А. В. Чадин[1], Е. К. Карсунцева[1], А. Д. Воронова[1], В. С. Шишкина[1], С. Ш. Каршиева[3], А. А. Степаненко[1], Ф. С. Сенатов[3], О. В. Степанова[1], В. П. Чехонин[1,2]

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

G. A. Fursa[1,2], A. V. Chadin[1], E. K. Karsuntseva[1], A. D. Voronova[1], V. S. Shishkina[1], S. Sh. Karshieva[3], A. A. Stepanenko[1], F. S. Senatov[3], O. V. Stepanova[1], V. P. Chekhonin[1,2]

[1]Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moskow
[2]Pirogov Russian National Research Medical University Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow
[3]National University of Science and Technology «MISIS», Moskow

✉ Gregorii.fursa@gmail.com

Аннотация

Было проведено сравнение различных вариантов биоинженерных конструктов на основе коллагена и фибрина в сочетании с обкладочными клетками в терапии кист спинного мозга. С помощью проведенных тестов было показано, что препарат с концентрацией фибрина 10 мг/мл лучше всего восстанавливает двигательную активность задних конечностей крыс после травмы спинного мозга.

Abstract

A comparison of various options for bioengineer constructs based on collagen and fibrin in combination with the ensheathing cells in the treatment of spinal cord cysts was carried out. With the help of tests, it was shown that the drug with a fibrin concentration of 10 mg/ml best restores the motor activity of the hind limbs of rats after a spinal cord injury.

Терапия травм спинного мозга — актуальная проблема современной медицины. Решением данной проблемы может являться применение клеточной терапии. Однако большое количество работ сконвертировано на использовании суспензии клеток. Данный подход сопряжен с высоким процентом гибели клеток в зоне введения [1]. Альтернативным подходом является доставка клеток в составе трехмерных конструктов, которые смогут имитировать естественное окружение клеток. Примером таких конструкций могут являться гидрогели. Данный тип контракты может быть введен в ткань через иглу, способствуя выживанию клеток в момент трансплантации и поддерживая их в дальнейшем. Особый интерес вызывают гидрогели на основе коллагена и фибрина, поскольку данные полимеры широко изучены, а их применение не сопряжено с риском для здоровья. Также немаловажно выбрать оптимальный клеточный компонент биоинженерного конструкта. Одним из наилучших вариантов являются обкладочные клетки из обонятельной выстилки, поскольку их получение безопасно для пациента, а множественные клинические испытания показали их безопасность [2]. Примечательно, что на сегодняшний не было изучено то, как данные полимеры ведут себя в терапии кисты спинного мозга в сочетании с обкладочными клетками обонятельной выстилки.

Целью данной работы является провести сравнение в эффективности биоинженерных конструктов на основе гидрогелей коллагена и фибрина для терапии кист спинного мозга

Обкладочные клетки из обонятельной выстилки человека были получены по разработанному нами протоколу [3]. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после травмы. В ходе эксперимента исследовали фибриновые гидрогели с концентрацией фибриногена 4 мг/мл и 10 мг/мл и 1 единицей тромбина,

* Работа выполнена в рамках государственного задания № 12402080066-3.

© Г. А. Фурса, А. В. Чадин, Е. К. Карсунцева, А. Д. Воронова, В. С. Шишкина, С. Ш. Каршиева, А. А. Степаненко, Ф. С. Сенатов, О. В. Степанова, В. П. Чехонин, 2024

а также коллагеновые гидрогели 1 мг/мл и 4 мг/мл. В тестах *in vitro* оценивали выживаемость клеток, меченных прижизненным мембранным красителем PKH-26, в гелях разной концентрации посредством теста с резазурином. 1 млн меченых PKH-26 клеток смешивали с раствором фибриногена (9 мкл) и смешивали с раствором тромбина (1 мкл) непосредственно перед введением. Также 1 млн меченых PKH-26 клеток смешивали с раствором нейтрального (pH = 7) коллагена на льду. Терапевтическая эффективность препаратов была оценена по улучшению двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель с помощью BBB-тестов.

В ходе тестов *in vitro* было показано, что клетки в гидрогелях в течение 7 суток эксперимента снижали свою жизнеспособность. В ходе тестов *in vivo* было показано, что биоинженерные конструкции на основе гидрогеля коллагена не превосходят в своей эффективности трансплантацию клеток. Схожая ситуация наблюдалась в группе с биоинженерными конструктами на основе фибриновых гидрогелей с концентрацией 4 мг/мл, однако более плотный гель с концентрацией 10 мг/мл фибриногена показал большую терапевтическую эффективность по сравнению с контрольной группой, включающую введение 10 мкл среды разведения. С точки зрения изменения морфометрических параметров кисты клетки в составе гидрогелей не превосходят по своей эффективности трансплантацию клеток.

Полученные результаты и последующее сравнение различных вариантов биоинженерных конструктов говорят нам о том, что применение фибриновых гидрогелей является более перспективным. Однако дальнейшие исследования, скорее, должны быть сосредоточены на поиске альтернативных полимеров, способных обеспечивать активную пролиферацию клеток.

Литература

1. Sivaraj D. et al. Hydrogel Scaffolds to Deliver Cell Therapies for Wound Healing // Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers, 2021. Vol. 9.

2. Reshamwala R. et al. Designing a Clinical Trial with Olfactory Ensheathing Cell Transplantation-Based Therapy for Spinal Cord Injury: A Position Paper // Biomedicines. 2022. Vol. 10. № 12. P. 3153.

3. Stepanova O. et al. Neurotrophin-3 Enhances the Effectiveness of Cell Therapy in Chronic Spinal Cord Injuries // Bull. Exp. Biol. Med. 2022. Vol. 173. P. 1–5.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-360

ВЛИЯНИЕ АНАКИНРЫ, ЛАМОТРИДЖИНА И ИХ КОМБИНАЦИИ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАРУШЕНИЯ У КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ

EFFECTS OF ANAKINRA, LAMOTRIGINE AND THEIR COMBINATION ON BEHAVIORAL AND MOLECULAR DYSFUNCTIONS IN RATS IN THE LITHIUM-PILOCARPINE MODEL OF TEMPORAL LOBE EPILEPSY

А. Р. Харисова, Д. С. Синяк, М. В. Захарова, О. Е. Зубарева, А. В. Зайцев

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

A. R. Kharisova, D. S. Sinyak, M. V. Zakharova, O. E. Zubareva, A. V. Zaitsev

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg

✉ adeliaharisova.ah@gmail.com

Аннотация

Проведен анализ влияния анакинры, ламотриджина и их комбинации на развитие поведенческих нарушений и изменений экспрессии генов астро- и микроглиальных белков в модели височной эпилепсии у крыс. Показано, что как монотерапия, так и комбинированное лечение, ослабляли некоторые из обнаруженных у экспериментальных животных поведенческих и молекулярных нарушений. Комбинированное лечение не оказалось более эффективным по сравнению с монотерапией.

Abstract

There was analyzed the effect of anakinra, lamotrigine and their combination on the development of behavioral disorders and changes in gene expression of astro- and microglial proteins in a model of temporal lobe epilepsy in rats. We showed that both monotherapy and combination treatment attenuated some of the behavioral and molecular abnormalities found in experimental animals. The combined treatment was not more effective compared to monotherapy.

Эпилепсия — тяжелое хроническое заболевание нервной системы, сопровождающееся развитием спонтанных рецидивирующих судорог. Около трети пациентов с эпилепсией невосприимчивы к проводимому лечению, что делает актуальным поиск новых методов лечения. Традиционно считается, что эпилепсия возникает из-за нарушения баланса тормозных и возбуждающих механизмов в нейронных сетях мозга. Однако препараты, направленные на подавление избыточного возбуждения нейронов, часто имеют побочные эффекты и не всегда способны предотвратить эпилептогенез.

Другим механизмом развития эпилепсии является нейровоспаление, связанное с активацией астро- и микроглиальных клеток. Показано, что применение противовоспалительной терапии позволяет ослабить эпилептогенез.

Мы предположили, что комплексная терапия, включающая традиционные и противовоспалительные препараты, может быть эффективнее монотерапии, так как будет направлена на различные механизмы развития эпилепсии. В качестве традиционного препарата в данном исследовании был выбран широко используемый в клинике препарат ламотриджин — блокатор потенциалзависимых натриевых каналов, в качестве противовоспалительного — антагонист рецепторов провоспалительного цитокина интерлейкина-1 (препарат анакинра).

Целью данной работы был анализ влияния анакинры, ламотриджина и их комбинации на развитие связанных с эпилептогенезом поведенческих нарушений и изменений экспрессии астро- и микроглиальных белков, вовлеченных в регуляцию эпилептогенеза. Учитывая, что микро- и астроглиальные клетки могут находиться в различных функциональных состояниях, связанных с повышенной продукцией повреждающих (A1 и M1 фенотипы) либо защитных белков (A2 и M2 фенотипы), мы оценили экспрессию генов не только провоспалительных, но и нейропротекторных белков, ослабляющих развитие эпилепсии.

Для индукции височной эпилепсии (ВЭ) самцам крыс Wistar в возрасте 7–8 недель вводили раствор LiCl (в/б, 127 мг/кг), через сутки — метилскополамин (в/б, 1 мг/кг), через 30 минут — пилокарпин (в/б, 20–30 мг/кг, до достижения судорог силой 4 балла по шкале Racine). Контрольным животным вводили LiCl и физиологический раствор. Сразу после индукции модели экспериментальных крыс разделяли на 4 группы: 1) нелеченые;

© А. Р. Харисова, Д. С. Синяк, М. В. Захарова, О. Е. Зубарева, А. В. Зайцев, 2024

2) лечение анакинрой (первые 5 дней дозировка 100 мг/кг, затем 5 дней — 50 мг/кг), 3) лечение ламотриджином (10 дней — 20 мг/кг); 4) комбинация анакинры и ламотриджина по тем же схемам.

Тестирование поведения и биохимических показателей проводили в хроническую фазу ВЭ модели (2 месяца после индукции модели). Поведение анализировали в тестах «Социальное взаимодействие», «Открытое поле» и «Водный лабиринт Морриса». После тестирования поведения производили забор мозга для анализа в гиппокампе и височной коре экспрессии генов микро- и астроглиальных белков (*Gfap, Aif1, Il1b, Nlrp3, Il1rn, Lcn2, S100a10, Nos2, Arg1*) с использованием ОТ-ПЦР в реальном времени.

В данном исследовании показано, что в тесте «Открытое поле» как монотерапия ламотриджином и анакинрой, так и комбинация этих препаратов нивелировала ВЭ-индуцированную гиперактивность, изменения исследовательского поведения и повышенную тревожность. В то же время в тестах «Социальное взаимодействие» и «Водный лабиринт Морриса» ни один из вариантов лечения не влиял на нарушения социального поведения и памяти, обнаруженные у экспериментальных крыс. Кроме того, все типы лечения оказали влияние на экспрессию генов астроцитарных, но не микроглиальных белков. В частности, показано, что анакинра и ламотриджин как по отдельности, так и в комбинации компенсировали вызванное ВЭ усиление экспрессии гена *Lcn2* (маркер А1 астроцитов), а монотерапия ламотриджином усиливала экспрессию гена *S100a10* (маркер А2 астроцитов).

Таким образом, применение как традиционной, так и противовоспалительной терапии ослабляло некоторые поведенческие и биохимические нарушения, развивающиеся в литий-пилокарпиновой модели ВЭ. Однако комбинированная терапия не оказалась более эффективной по сравнению с монотерапией анакинрой или ламотриджином.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-361

ГИПОКОАГУЛЯЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ КРАТКОВРЕМЕННЫХ Xe/O_2-ИНГАЛЯЦИЙ *

HYPOCOAGULATION EFFECTS OF SHORT-TERM XE/O_2 INHALATION

Д. В. Цуран, А. А. Золотарев, С. С. Наумов, Д. Н. Евтушенко, Е. В. Удут

Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

D. V. Tsuran, A. A. Zolotarev, S. S. Naumov, D. N. Evtushenko, E. V. Udut

Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Centre RAS

✉ zolotarevf_aleksey@inbox.ru

Аннотация

В работе проведена оценка влияния кратковременных ингаляций Xe/O_2 на систему гемостаза с использованием методов тромбоэластографии, низкочастотной пьезотромбоэластографии и агрегации тромбоцитов.

Abstract

The effect of short-term inhalation of He/O_2 on the hemostasis system was evaluated using thromboelastography, low-frequency piezotromboelastography and platelet aggregation methods.

Основанием для детального анализа системы гемостаза при кратковременных ингаляциях Xe/O_2 послужили клинические наблюдения, показавшие их эффективность в восстановлении после инфекции COVD-19. Целью работы явилось изучение влияния ксенона на систему гемостаза. Лабораторное сопровождение кратковременных ингаляций Xe/O_2 смеси, используемых для купирования целого ряда синдромов, проводилось по данным глобальных тестов диагностики реакции гемостаза: тромбоэластографии (ТЭГ) и низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ). В *in vitro* эксперименте была изучена спонтанная агрегация тромбоцитов и их агрегационная функция при использовании активаторов — АДФ, коллаген, ристомицин, адреналин.

Результаты

По данным ТЭГ и НПТЭГ выявлено формирование гипокоагуляционного фенотипа гемостатического потенциала. Это проявлялось статистически значимым увеличением времени реакции по ТЭГ (до 18 % от исходных значений) и приростом таких характеристик НПТЭГ, как время начала реакции (до 25 % от исходного) и достижение точки «желирования» (до 20 % от исходного). При этом значимых изменений в клоттинговых, амидолитических и иммуноферментных тестах гемостазиограммы выявлено не было.

Принимая во внимание то, что зарегистрированные изменения гемостаза определены на начальных фазах свертывания крови, где ключевая роль принадлежит процессам активации тромбоцитов — их агрегации и адгезии, и вопреки существующим данным об отсутствии влияния Xe на тромбоцитарные функции [1, 2], результатом исследования *in vitro* явилось выраженное, до 50 %, снижение спонтанной агрегации тромбоцитов в условиях Xe/O_2 ингаляций. Принципиальные данные по снижению агрегации тромбоцитов на такие индукторы, как адреналин и ристомицин, до ≈ 19 и ≈ 18 % соответственно. При этом наиболее значимое снижение агрегации тромбоцитов зарегистрировано для таких индукторов, как АДФ и коллаген (на ≈ 30 %), что, вероятно, объясняется представительством их рецепторного аппарата на мембране тромбоцита и участием кальциевых каналов в реализации индукции. Полученные данные определенным образом подтверждают мембранную теорию реализации неспецифических эффектов ксенона [3].

Литература

1. Saravanan P., Exley A. R., Valchanov K., Casey N. D. Falter F. Impact of xenon anaesthesia in isolated cardiopulmonary bypass on very early leucocyte and platelet activation and clearance: a randomized, controlled study // British Journal of Anaesthesia. 2009. Vol. 103 (6). P. 805–810.

2. Rossi L. W., Horn N. A., Baumert J. H., Gutensohn K., Hutschenreuter G., Rossaint R. Xenon Does Not Affect Human Platelet Function In Vitro // Anesthesia and analgesia. 2001. Vol. 93. P. 635–640.

3. Booker R. D., Sum A. K. Biophysical changes induced by xenon on phospholipid bilayers // Biochimica et Biophysica Acta. 2013. Vol. 1828. P. 1347–1356.

* Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 22-15-20041).

© Д. В. Цуран, А. А. Золотарев, С. С. Наумов, Д. Н. Евтушенко, Е. В. Удут, 2024

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-362

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИНА Е6 В КОЖЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ЛАЗЕРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

DISTRIBUTION OF CHLORINE E6 IN THE SKIN UNDER VARIOUS LASER EXPOSURE MODES

Д. И. Чернопятов[1], С. Д. Никонов[2], В. В. Нимаев[1]

[1]НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск
[2]НИИ туберкулеза, Новосибирск

D. I. Chernopyatov[1], S. D. Nikonov[2], V. V. Nimaev[1]

[1]Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — branch of the Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk
[2]Research Institute of Tuberculosis, Novosibirsk

✉ danila.chernopyatov@ya.ru

Аннотация

Исследование направлено на изучение распределения хлорина е6 при его локальном применении на здоровой коже и коже, подвергнутой предварительному лазерному воздействию. Эксперимент на мышах показал, что неабляционный фракционный лазерный фототермолиз улучшает проницаемость кожи для фотосенсибилизатора, тем самым увеличивая эффективность препарата.

Abstract

The study aims to investigate the distribution of chlorine e6 when applied locally to healthy skin and skin subjected to preliminary laser exposure. An experiment on mice showed that non-ablative fractional laser photothermolysis improves skin permeability for a photosensitizer, thereby increasing the effectiveness of the drug

Фотодинамическая терапия (ФДТ) — современный метод лечения, который изначально использовался для воздействия на злокачественные опухоли. Со временем область применения ФДТ расширилась, и сегодня этот метод применяется в дерматологии, косметологии, хирургии ран [1]. ФДТ — это неинвазивный метод лечения, основанный на использовании фотосенсибилизаторов (ФС) и неионизирующего света. В присутствии кислорода эти элементы запускают фотохимические реакции, которые воздействуют на клетки и обладают антибактериальным действием [2]. Фотосенсибилизатор — ключевой компонент ФДТ. Хорошие терапевтические результаты и возможность сочетания ФДТ с другими методами лечения делают ее широко используемой в медицине. Однако есть и ограничения. Они связаны с необходимостью выбора источника лазерной энергии, так как лазерный луч проникает на ограниченную глубину [3]. Также важен способ доставки фотосенсибилизатора к нужной области. Чтобы лекарственные средства могли легче проникать в кожу, в современной медицине применяют различные подходы, включая использование лазерной энергии. Особенно привлекательны методики абляционного и неабляционного фракционного лазерного фототермолиза (ФЛФ). Абляционные методики (аФЛФ) позволяют глубоко повредить кожу, что, однако, сопряжено с побочными эффектами [4]. Неабляционное воздействие (нФЛФ), напротив, вызывает поверхностное «нагревание» кожи, не приводя к прямому повреждению тканей. Этот метод требует проведения нескольких сеансов для достижения желаемого результата [5].

Целью исследования стало изучение распределения хлорина Е6 в эксперименте при его локальном применении на здоровой коже, а также на здоровой коже, после предварительного воздействия нФЛФ.

Для исследования мы выбрали фотосенсибилизатор «РадаГель» с действующим веществом радахлорин (натриевая соль хлорина е6). Эксперимент проводился на мышах (n = 52), которых разделили на группы в зависимости от метода воздействия на кожу: 1) контрольная группа; 2) группа с изолированным воздействием (нФЛФ); 3) группа с нанесением фотосенсибилизатора; 4) группа с нанесением фотосенсибилизатора после предварительного воздействия нФЛФ. В день эксперимента, на 7, 14 и 28 сутки проводилась эвтаназия животных с последующим забором кожных лоскутов для исследований. Использовались методы лазерной конфокальной микроскопии криосрезов, световой и электронной микроскопии кожи.

© Д. И. Чернопятов, С. Д. Никонов, В. В. Нимаев, 2024

Исследование показало, что предварительная обработка кожи методом нФЛФ улучшает проникновение фотосенсибилизатора хлорина Е6 при локальном применении. Это открывает новые перспективы для понимания механизмов действия и эффективности адресной доставки лекарственных препаратов. По нашему мнению, после инициирующего короткого неинвазивного импульса лазерной энергии включается активный механизм трансдермального транспорта, включающий миграцию фагоцитирующих иммунных клеток к участку микроповреждения эпидермиса что обеспечивает более глубокое проникновение радахлорина. Отсутствие аутофлуоресценции в подкожной клетчатке после нФЛФ свидетельствует о реакции фотовыбеливания эндогенных хромофоров под влиянием лазерных импульсов на длине волны 970 нм. Это создает предпосылки к успешному трансдермальному транспорту радахлорина. Необходимы дальнейшие исследования механизмов влияния сфокусированной импульсной лазерной энергии различных длин волн на проницаемость кожи для радахлорина и других фотосенсибилизаторов.

Литература

1. Svyatchenko V.A., Nikonov S.D., Mayorov A.P., Gelfond M.L., Loktev V.B. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin // Photodiagnosis Photodyn Ther. 2021 Mar; 33:102112.

2. Awan M.A., Tarin S.A. Review of photodynamic therapy // The Surgeon. 2006. Aug;4(4): 231–236.

3. Тучин В.В. Исследование биотканей методами светорассеяния // УФН. 1997;167: 517–539.

4. Manstein D., Herron G.S., Sink R.K., Tanner H., Anderson R.R. Fractional photothermolysis: A new concept for cutaneous remodeling using microscopic patterns of thermal injury // Lasers Surg. Med. 2004;34:426–438.

5. Allemann I.B., Kaufman J. Fractional photothermolysis — an update // Lasers Med. Sci. 2010;25:137–144.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-363

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ОКСИДОВ БИОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO*

EVALUATION OF THE CYTOTOXICITY OF BIOGENIC METAL OXIDES AGAINST HUMAN TUMOR CELLS *IN VITRO* MODELS

Чжэн Вэньцзин[1], И. А. Разумов[1,2]

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

Zheng Wenjing[1], I. A. Razumov[1,2]

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

✉ v.chzhen@g.nsu.ru

Аннотация

Рак является серьезной глобальной проблемой общественного здравоохранения. В данной работе на основе моделей *in vitro* была оценена цитотоксичность различных типов наночастиц металлов (марганца, кобальта, хрома, меди и никеля) в различных концентрациях на жизнеспособность опухолевых (U87, SK-Mel-28, Hep G2, 786-O) и здоровых (BJ-5ta) клеток человека с помощью МТТ-теста и метода клонирования клеток.

Abstract

Cancer is a major global public health problem. In this work, the cytotoxicity of different types of metal nanoparticles (manganese, cobalt, chromium, copper and nickel) at different concentrations on the viability of human tumor (U87, SK-Mel-28, Hep G2, 786-O) and normal (BJ-5ta) cells is studied using *in vitro* models using the MTT assay and cell cloning method.

Введение

Всем известно, что рак — это многофазное заболевание, вызываемое сложной смесью генетических и экологических факторов. По данным Международного агентства по исследованию рака Всемирной организации здравоохранения, ожидается, что к 2050 году во всем мире будет зарегистрировано более 35 миллионов новых случаев рака. В настоящее время набирает актуальность использование нанотехнологий в лечении онкологических заболеваний. Наночастицы (НЧ) обычно определяются как сверхмалые частицы диаметром от 1 до 1000 нанометров и могут состоять из различных материалов, таких как липиды, полимеры или металлы. Все они обладают уникальными преимуществами доставки, поэтому применение наночастиц в диагностике и лечении опухолей постепенно расширяется [1]. В частности, наночастицы оксидов металлов могут стать потенциальным агентом, как для диагностики, так и для противоопухолевой терапии. Например, было показано, что наночастицы кобальта обладают очень низкой цитотоксичностью против нормальных клеток, в то время как та же доза наночастиц кобальта показала сильный ингибирующий эффект против раковых клеток [2, 3].

Для успешного использования наночастиц необходимо решение проблемы селективной цитотоксичности и целевого накопления наночастиц именно в органах-мишенях, а не распределения во всем организме, что приводит к нежелательным токсическим эффектам.

Объекты и методы

В качестве объектов исследования выступали наночастицы оксидов металлов (марганца, кобальта, хрома, меди и никеля**)**, полученные из ФИЦ Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН. Влияние НЧ на жизнеспособность опухолевых (U87, SK-Mel-28, Hep G2, 786-O) и здоровых (BJ-5ta) клеток человека оценивали с помощью МТТ-теста и метода клонирования клеток по стандартным методикам.

Цель работы — экспериментально оценить влияние наночастиц оксидов биогенных металлов на культуры опухолевых клеток человека для выяснения избирательности действия этих наночастиц на опухолевые клетки человека различного тканевого происхождения.

© Чжэн Вэньцзин, И. А. Разумов, 2024

Результаты

Определены токсические эффекты в клоногенном тесте и полулетальные дозы (IC50) в MTT методе (см. таблицу) для всех исследованных препаратов наночастиц. Полученные экспериментальные результаты показали, что из 5 изученных наночастиц 4, наночастицы марганца, кобальта, меди, никеля, обладают цитотоксичностью по отношению к нормальным и опухолевым клеткам человека, тогда как наночастицы хрома практически не токсичны в изучаемых концентрациях для здоровых и опухолевых клеток.

Цитотоксичность (IC50, мг/мл) НЧ в отношении клеток U-87, SK-Mel-28, HepG2, 786-O и BJ-5ta по результатам MTT-теста

НЧ	Концентрация НЧ, мг/мл	U87	SK-Mel-28	Hep-G2	786-O	BJ-5ta
MnO	2	0,0145	0,0254	0,0034	*	0,0329
Cu	0,3	0,0050	0,0937	0,0305	0,1118	0,0926
Co	3	0,0043	0,0050	0,0037	0,0104	0,0034
Ni	0,1	0,0030	0,0035	0,0030	*	0,0013

Примечание. * Не определено.

Заключение

В ходе экспериментальных исследований на моделях *in vitro* была изучена цитотоксичность наночастиц биогенных металлов (марганца, кобальта, меди, хрома и никеля) против опухолевых клеток человека различного тканевого происхождения. В результате было отмечено, что выявленная цитотоксичность биогенных металлов против опухолевых клеток человека зависит, по-видимому, от тканевого происхождения опухолевых клеток. Данное наблюдение, по нашему мнению, требует дальнейшего изучения. Кроме того, последующие эксперименты будут посвящены изучению целевого накопления данных наночастиц в культурах клеток различных типов опухолей.

Литература

1. Mukalel A. J., Riley R. S., Zhang R., Mitchell M. J. Nanoparticles for nucleic acid delivery: Applications in cancer immunotherapy // Cancer Lett. 2019, 458. P. 102–112.

2. Ansari S. M., Bhor R. D., Pai K. R., Sen D., Mazumder S., Ghosh K., Kolekar Y. D., Ramana C. V. Cobalt nanoparticles for biomedical applications: Facile synthesis, physiochemical characterization, cytotoxicity behavior and biocompatibility // Appl. Surf. Sci. 2017. 414. P. 171–187.

3. Huang X., Cai H., Zhou H., Li T., Jin H., Evans C. E., Cai J., Pi J. Cobalt oxide nanoparticle-synergized protein degradation and phototherapy for enhanced anticancer therapeutics // Acta Biomater. 2021, 121. P. 605–620.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-364

КОМБИНАЦИИ ГЕНОТИПОВ SNPS TNFRSF11B И TNFA У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ

COMBINATIONS OF SNPS TNFRSF11B AND TNFA GENOTYPES IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS IN RUSSIAN POPULATION OF THE CHELYABINSK REGION

Ю. В. Чумачёва, Д. С. Сташкевич, Д. М. Шмелькова

Челябинский государственный университет

J. V. Chumacheva, D. S. Stashkevich, D. M. Smelkova

Chelyabinsk State University

✉ miraculouslilac@yandex.ru

Аннотация

Гены цитокинов и их рецепторов влияют на характер иммунного ответа при ревматоидном артрите (РА) через уровень продукции кодируемых белков, что делает функциональный полиморфизм генов цитокинов особенно интересным для исследования при РА. В нашем исследовании мы провели оценку частот сочетаний генотипов полиморфизмов генов TNFRSF11B в точке G1181C и TNFA в точке G-238A у популяции русских больных РА и контрольной группы для выявления возможных ассоциаций.

Abstract

Cytokine genes and their receptors influence the nature of the immune response in rheumatoid arthritis (RA) through the level of production of encoded proteins, which makes the functional polymorphism of cytokine genes particularly interesting for research in RA. In our study, we evaluated the frequencies of combinations genotype of polymorphisms of TNFRSF11B genes at point G1181C and TNFA at point G-238A in population of Russian RA patients and a control group to identify possible associations.

Введение

Ревматоидный артрит (РА) представляет собой хроническое воспалительное заболевание суставов, обусловленное аутоиммунными процессами и дисбалансом иммунной системы. При РА наблюдаются повышенные уровни воспалительных цитокинов, таких как TNFa, IL-6 и IL-1, которые способствуют эрозии костей и прогрессированию заболевания.

Одним из ключевых патофизиологических механизмов при РА является активация транскрипционного фактора NF-kB, однако в последние десятилетия особое внимание привлек недавно открытый рецептор активатор лиганда ядерного фактора Каппа-B (RANKL) [1]. RANKL, также связанный с активацией NF-kB и эрозией костей, стал важным объектом исследований в области лечения РА.

При ревматоидном артрите иммунные клетки, такие как макрофаги и Т-лимфоциты, активируются и начинают продуцировать избыточное количество TNFa. TNFa стимулирует остеокласты к разрушению суставов и костей, что приводит к хроническому воспалению и дегенеративным изменениям в суставах. OPG, белок, кодируемый геном TNFRSF11B, действует как конкурентный рецептор для TNFa, связываясь с ним и предотвращая его взаимодействие с клеточными рецепторами. Таким образом, уровень OPG в организме может влиять на баланс между воспалительным действием цитокина TNFa и его ингибирующим эффектом на костную ткань. Нарушение этого баланса в сторону провоспалительных цитокинов ведет к хроническому воспалению и разрушению суставов, что является характерной чертой РА.

На основании вышеизложенного мы предположили, что полиморфизмы генов TNFRSF11B и TNFA могут быть ассоциированы с предрасположенностью к ревматоидному артриту. Одним из важных полиморфизмов TNFa является G-238A, который отвечает за уменьшение продукции белка. Одновременно с этим полиморфизм гена TNFRSF11B в позиции 1181 изменяет свойства белка OPG, снижая его способность связываться с RANKL и нарушая баланс сигнального пути RANKL/RANK/OPG [2].

Исходя из вышесказанного, **цель** нашего исследования — оценить распределение частот сочетаний генотипов SNPs TNFRSF11B в точке G1181C и TNFA в точке G-238A у больных РА в сравнении с контрольной группой.

© Ю. В. Чумачёва, Д. С. Сташкевич, Д. М. Шмелькова, 2024

Материалы и методы

Выборка больных РА русской популяции состояла из 180 человек (средний возраст 51,7 ± 1,3 на момент формирования группы). В качестве группы сравнения использовали коллекцию образцов ДНК 198 кадровых доноров стволовой клетки ГБУЗ «ЧОСПК», проживающих в г. Челябинске и Челябинской области, сформированную случайным образом (средний возраст 34,6 ±0,75 на момент формирования группы). Принадлежность к этнической группе определялась по данным генеалогического анамнеза до третьего поколения. Генотипирование полиморфного локуса TNFRSF11B проводили методом аллель-специфической ПЦР (реактивы ООО «НПФ Литех»), а генотипирование полиморфного локуса TNFA — методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Для расчета достоверности различий аллелей и генотипов использовали: программу Past, критерий χ^2, OR с расчетом 95%-го ДИ, онлайн-приложения: Медицинская статистика [https://medstatistic.ru]. Во всех случаях различия считали статистически значимыми при $p \leqslant 0,05$.

Результаты исследования

В ходе проведенного исследования получены следующие результаты.

При исследовании сочетаний генотипов TNFRSF11B в точке 1181G/C и TNFA в точке -238G/A были определены следующие комбинации (см. таблицу).

Сочетания генотипов TNFRSF11B в точке 1181G/C и TNFA в точке –238G/A

Сочетания генотипов TNFRSF11B и TNFA	Больные РА N = 180	Контрольная группа N = 198	χ^2, p, OR, ДИ
1181C/C— –238A/A	0 %	0 %	p > 0,05
1181C/C— –238G/A	13 %	6,5 %	p > 0,05
1181C/C— –238G/G	87 %	93,5 %	p > 0,05
1181G/C— –238A/A	0 %	0 %	p > 0,05
1181G/C— –238G/A	10 %	2,8 %	χ^2=4,44, p=0,04, OR=4,04, CI=[1,01;16,23]
1181G/C— –238G/G	90 %	97,2 %	χ^2 = 4,44, p =0,04, OR = 0,25, CI = [0,06;0,99]
1181G/G— –238A/A	0 %	0 %	p > 0,05
1181G/G— –238G/A	11,9 %	6,5 %	p > 0,05
1181G/G— –238G/G	88,1 %	93,5 %	p > 0,05

Было обнаружено два сочетания генотипов TNFRSF11B и TNFA.

1. Сочетание генотипов 1181G/C— –238G/A (10 % против 2,8 %, χ^2 = 4,44, p = 0,04), носители которого чаще обнаруживались среди больных РА по сравнению с контрольной выборкой. Отношение шансов указывает на то, что данное сочетание можно рассматривать как предрасполагающее к развитию РА (OR = 4,04, CI = [1,01; 16,23]).

2. Сочетание генотипов 1181G/C— –238G/G (90 % против 97,2 %, χ^2 = 4,44, p = 0,04), носители которого чаще обнаруживались среди контрольной группы по сравнению с больными РА. Согласно критерию OR сочетание генотипов 1181G/C— –238G/G, возможно, может выступать как протектор к РА (OR = 0,25, CI = [0,06; 0,99]).

Выводы

Были установлены особенности частот сочетаний генотипов генов TNFRSF11B и TNFA 1181G/C— –238G/A и 1181G/C— –238G/G в группе больных ревматоидным артритом. Проведенное нами исследование является продолжением изучения комплексной оценки взаимодействия цитокинов и их рецепторов суперсемейства TNFa как иммуногенетического компонента РА.

Литература

1. Ilchovska D. D., Barrow D. M. An Overview of the NF-kB mechanism of pathophysiology in rheumatoid arthritis, investigation of the NF-kB ligand RANKL and related nutritional interventions. Autoimmun Rev. 2021 Feb; 20(2):102741. DOI: 10.1016/j.autrev.2020.102741. Epub 2020 Dec 17. PMID: 33340772.

2. Чумачёва Ю. В. Полиморфизм генов TNFRSF11B и TNFA и их возможные ассоциации с ревматоидным артритом // Наука будущего — наука молодых: VII Всерос. молодежный форум. Сб. тезисов докладов участников, Новосибирск, 23–26 августа 2022 года.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-365

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ МИКРОРНК МОЧИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ *

EXTRACELLULAR MIRNAS IN THE URINE OF PROSTATE CANCER PATIENTS AS POTENTIAL MARKERS OF THERAPY EFFECTIVENESS

Е. В. Шутко[1,3], Г. Саллум[1], О. Е. Брызгунова[1], Е. А. Мурина[1],
И. А. Остальцев[2], С. В. Пак[2], П. П. Лактионов[1,2], М. Ю. Коношенко[1]

[1] *Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
[2] *Национальный медицинский исследовательский центр им. акад. Е. Н. Мешалкина, Новосибирск*
[3] *Новосибирский государственный университет*

E. V. Shutko[1,3], G. Salloum[1], O. E. Bryzgunova[1], E. A. Murina[1],
I. A. Ostal'cev[2], S. V. Pak[2], P. P. Laktionov[1,2], M. Y. Konoshenko[1]

[1] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
[2] *Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk*
[3] *Novosibirsk State University*

✉ katshutko@gmail.com

Аннотация

Анализ аберрантной экспрессии микроРНК мочи является потенциально ценным неинвазивным маркером эффективности лечения. Источником перспективных для прогностических целей микроРНК могут служить супернатант и внеклеточные везикулы мочи. С помощью анализа экспрессии 14 выбранных микроРНК мочи пациентов с раком предстательной железы (РПЖ) до и через 3, 6 и 12 месяцев после радикальной простатэктомии и лучевой терапии, выявлены пары микроРНК — потенциальные маркеры эффективности терапии.

Abstract

Analysis of aberrant urinary miRNA expression has the potential to be a valuable non-invasive marker of treatment efficacy. The supernatant and extracellular vesicles of urine can serve as a source of promising miRNAs for prognostic purposes. By analyzing the expression of 14 selected miRNAs in the urine samples of patients with prostate cancer before and 3, 6 and 12 months after radical prostatectomy and radiation therapy, miRNA ratios were identified as potential markers of therapy effectiveness.

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) на протяжении долгих лет занимает лидирующие позиции по заболеваемости и смертности среди мужчин. Подбор метода лечения — в частности, широко распространенных радикальной простатэктомии (РПЭ) или лучевой терапии (ЛТ) — и оценка эффективности терапии остаются актуальными проблемами, поскольку нередко (20–40 % после РПЭ и 31–46 % случаев после ЛТ) наблюдается рецидив заболевания в течение 5 лет после лечения.

Одним из наиболее перспективных подходов является анализ относительной экспрессии микроРНК мочи, поскольку при развитии многих заболеваний, в том числе онкологических, а также в процессе терапии, наблюдается аберрантная экспрессия маркерных микроРНК.

Целью исследования является анализ динамики относительной экспрессии микроРНК мочи (внеклеточных везикул (ВВ) и супернатанта) у больных РПЖ после РПЭ и ЛТ с точки зрения поиска наиболее перспективных прогностических маркеров.

Материалы и методы

Образцы мочи 22 больных РПЖ до и после РПЭ (через 3, 6 и 12 месяцев) и 10 больных РПЖ до и после ЛТ (через 3, 6 и 12 месяцев), а также 18 здоровых доноров (ЗД) получены из ОПК и радиологического отделения НМИЦ имени академика Е. Н. Мешалкина (Новосибирск, Россия). Фракции супернатанта и ВВ мочи были выделены методами последовательных центрифугирований и агрегации-преципитации с использованием полиэтилен-

* Исследование выполнено при поддержке РНФ (проект № 23-25-10026) в рамках поддержанного Правительством Новосибирской области проекта 000000540699598235120582/ № р-45.

© Е. В. Шутко, Г. Саллум, О. Е. Брызгунова, Е. А. Мурина, И. А. Остальцев, С. В. Пак, П. П. Лактионов, М. Ю. Коношенко, 2024

гликоля и декстрана синего. Из полученных фракций мочи были выделены микроРНК с использованием стекловолокнистых фильтров. С помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени были получены данные о пороговых циклах детекции каждой из 14 (hsa-miRNA-19b, -22-3p, -30e, -31, -92a, -125b, -144, -200b, -205, -222, -375, -378a, -425, -660) выбранных на основе литературных данных и биоинформатического анализа микроРНК в образцах здоровых и больных доноров. Для нормализации полученных результатов использовали метод попарной нормировки. Работа выполнена в ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Результаты

Для определения пар микроРНК, достоверно изменивших относительную экспрессию после РПЭ или ЛТ, использовали дисперсионный анализ повторных измерений. Было выявлено 29 и 22 пар микроРНК, изменивших экспрессию после РПЭ и ЛТ соответственно в супернатанте мочи, а также 22 и 40 таких пар во фракции ВВ мочи. Эти пары микроРНК можно разделить на различные группы с одинаковыми паттернами динамики экспрессии для обоих видов терапии.

Наиболее значимыми критериями для разделения пар микроРНК на группы были признаны направление изменения экспрессии после терапии и достоверные различия между уровнями экспрессии микроРНК до лечения и через год после. Основной интерес с точки зрения оценки эффективности терапии представляют собой пары микроРНК, относительная экспрессия которых после лечения приблизились к таковой у здоровых доноров: 9 и 2 пары микроРНК после РПЭ и ЛТ соответственно в супернатанте и 10 и 27 во фракции ВВ мочи.

Кроме того, был выявлен ряд пар микроРНК как в супернатанте, так и во фракции ВВ мочи, по уровням относительной экспрессии которых спустя год после терапии достоверно отличались от всех остальных некоторые пациенты с признаками рецидива онкозаболевания, такими как вторичные изменения в тазовых лимфоузлах или повышенный уровень простат-специфического антигена в крови.

Выявленные закономерности позволяют предположить высокий потенциал микроРНК в качестве маркеров рецидива РПЖ, что может быть использовано при корректировке терапии после первичного лечения РПЭ или ЛТ.

Исходя из полученных результатов, во фракции ВВ мочи было выявлено большее количество потенциально прогностически значимых пар, чем в бесклеточной фракции. Кроме того, 5 пар микроРНК (miRNA-31/375, miRNA-30e/92a, miRNA-30e/205, miRNA-125b/660, miRNA-200b/375) во фракции ВВ мочи были определены как наиболее перспективные для оценки эффективности как РПЭ, так и ЛТ.

Тем не менее для разработки высокоэффективных прогностических панелей многообещающими выглядят смешанные панели, состоящие частично из везикулярных микроРНК и частично из микроРНК из фракции супернатанта мочи, что может способствовать высокой точности и надежности таких потенциальных клинических тестов, поэтому фракции ВВ и супернатанта мочи представляют большой интерес с точки зрения прогностических целей.

Выводы

Описана годовая динамика экспрессии микроРНК после РПЭ и ЛТ и выявлены наиболее перспективные прогностические пары микроРНК. Оценка эффективности лечения РПЖ путем анализа относительной экспрессии выявленных пар микроРНК, достоверно изменяющих свою экспрессию после терапии, представляет собой потенциально ценный клинический инструмент.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-366

МИКРОБИОМ И МИКРОБИОТА ГЛАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТИ В НОРМЕ У ЧЕЛОВЕКА

MICROBIOME AND MICROBIOTA OF THE OCULAR SURFACE IN NORMAL HUMANS

Р. Р. Язгарова, Т. И. Биккузин

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

R. R. Yazgarova, T. I. Bikkuzin

Bashkir State Medical University, Ufa

✉ rozaliuyazgarova@gmail.com

Аннотация

Систематический анализ о нормальном составе микроорганизмов глазной поверхности человека поможет систематизировать знания, которые в дальнейшем может стать важным для идентификации результатов и бактериологических исследований для лечений и профилактики.

Abstract

A systematic analysis of the normal composition of microorganisms of the human ocular surface will help to systematize knowledge, which in the future may become important for identifying the results and bacteriological studies for treatment and prevention.

В настоящее время отсутствует четкие критерии при описании характеристики нормы микробиоты и микробиома глаза (в т. ч. какие его колебания нужно считать нормальными в течение жизни, а какие нет), недостаточно полно исследованы особенности и влияние состава микроорганизмов на иммунитет и организм в целом, а также зависимость ее от пола, возраста, особенностей проживания человека и т. д. Ответы на указанные вопросы дадут только результаты дальнейших исследований бактериального состава глаза.

Из проведенного анализа доступных статей по микробиоте и микробиому глазной поверхности у взрослых пациентов без заболеваний глаза и не носящих линзы можно предположить, что разные способы изучения бактериального сообщества глазной поверхности дают различные представления о преобладающих микроорганизмах. Культуральные методы указывают на преобладание коккоморфных бактерий, включая стафилококковые. Согласно культурным данным, нормальная глазная поверхность микрофлора обычно состоит из *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* и *Micrococcus* [1]. С другой стороны, метагеномное секвенирование выявляет преобладание палочковидных бактерий. Анализ метагеномных данных указывает на присутствие *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* и возможно *Bacillus* как основных представителей микрофлоры глазной поверхности [2–6]. В настоящее время важно дальнейшее изучение влияния факторов хозяина, таких как возраст и пол, на состав микробиома поверхности глаз, поскольку эти аспекты остаются предметом дискуссий в исследованиях данной области [7].

Полученные данные ценны, поскольку расширяют понимание механизмов возникновения заболеваний и создания новых методик диагностики и лечения, учитывающий индивидуальный состав микробиоты пациента. Это позволит разрабатывать персонализированные методы терапии, направленные на коррекцию микробного баланса, что может значительно повысить эффективность лечения и профилактики заболеваний глаз. Такой подход соответствует современному вектору развития медицины «Концепция 4П» (Классификация президента Института системной биологии Лерой Худ, Сиэттл, 2008 г.).

Литература

1. Huang Y. S., Dai Y. H., Sun S. Y., Lan J., Xie L. X. Study of different methods in reducing conjunctival bacteria before cataract surgery. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2009. Sep 22;89(35):2458-61. Chinese.

2. Doan T., Akileswaran L., Andersen D., Johnson B., Ko N., Shrestha A., Shestopalov V., Lee C. S., Lee A. Y., Van Gelder R. N. Paucibacterial Microbiome and Resident DNA Virome of the Healthy Conjunctiva // Invest. Ophthalmol Vis. Sci. 2016. Oct 1;57(13):5116-5126.

© Р. Р. Язгарова, Т. И. Биккузин, 2024

3. Dong Q., Brulc J. M., Iovieno A., Bates B., Garoutte A., Miller D., Revanna K. V., Gao X., Antonopoulos D. A., Slepak V. Z., Shestopalov V. I. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. Jul 20;52(8):5408-13.

4. Dong X., Wang Y., Wang W., Lin P., Huang Y. Composition and Diversity of Bacterial Community on the Ocular Surface of Patients With Meibomian Gland Dysfunction // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2019. Nov 1;60(14):4774–4783.

5. Ham B., Hwang H. B., Jung S. H., Chang S., Kang K. D., Kwon M. J. Distribution and Diversity of Ocular Microbial Communities in Diabetic Patients Compared with Healthy Subjects // Curr. Eye. Res. 2018 Mar.;43(3):314-324.

6. Lee J., Alam J., Choi E., Ko Y. K., Lee A., Choi Y. Association of a dysbiotic oral microbiota with the development of focal lymphocytic sialadenitis in IκB-deficient mice // NPJ Biofilms Microbiomes. 2020. Oct 30;6(1):49.

7. Бхарати М., Джаяхар Р., Рамакришнан Р., Минакши С., Падмавати С., Шивакумар С., Шринивасан М. Микробный кератит в Южной Индии: влияние факторов риска, климата и географических особенностей // Офтальмологическая эпидемиология. 2007. Т. 14. № 2. С. 61–69.

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-367

БУСТЕРНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ КАНДИДАТНОЙ ПОЛИЭПИТОПНОЙ ДНК-ВАКЦИНОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТРУЙНОЙ ИНЖЕКЦИИ ПРИВОДИТ К ЗНАЧИТЕЛЬНОМУ УСИЛЕНИЮ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА *

BOOSTER IMMUNIZATION OF MICE WITH A CANDIDATE POLYEPITOPE DNA VACCINE USING JET INJECTION LEADS TO A SIGNIFICANT INCREASE IN THE T-CELL IMMUNE RESPONSE

В. А. Яковлев, М. Б. Боргоякова, Е. В. Тигеева, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, Л. И. Карпенко

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

V. A. Yakovlev, M. B. Borgoyakova, E. V. Tigeeva, D. N. Kisakov, L. A. Kisakova, L. I. Karpenko

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

✉ yva20009@mail.ru

Аннотация

Т-клеточный иммунный ответ является важной частью иммунитета против SARS-CoV-2. В данной работе показано, что разработанная кандидатная ДНК-вакцина pBSI-COV-Ub обладает способностью индуцировать Т-клеточный иммунитет у мышей линии Balb/c. Наиболее эффективно иммунный ответ стимулировался при двукратном в/м введении вакцины с последующей бустерной иммунизацией с использованием струйной инжекции.

Abstract

The T-cell immune response is an important part of immunity against SARS-CoV-2. In this work, it was shown that the developed candidate DNA vaccine pBSI-COV-Ub has the ability to induce T-cell immunity in Balb/c mice. The immune response was most effectively stimulated by double intramuscular administration of the vaccine, followed by booster immunization using jet injection.

Пандемия COVID-19 стала серьезным испытанием для всего мира. В 2023 году ВОЗ отменила статус пандемии, отмечая при этом, что вирус SARS-CoV-2 по-прежнему остается серьезной угрозой для здоровья населения. Ряд последних исследований показывает, что Т-клеточный ответ играет важную роль в защите организма от вируса, так как после перенесенной инфекции он более устойчив во времени и показывает высокую консервативность в отношении различных субтипов вируса. Этот факт свидетельствует о важности и актуальности разработки вакцин, способных эффективно стимулировать Т-клеточный иммунный ответ. Наиболее перспективным подходом в этом направлении являются ДНК-вакцины, кодирующие искусственные антигены, содержащие множество Т-клеточных эпитопов.

Ранее в ГНЦ ВБ «Вектор» был спроектирован Т-клеточный полиэпитопный иммуноген — BSI-COV-Ub [1], включающий консервативные фрагменты из различных белков SARS-CoV-2, содержащие наибольшее количество Т-клеточных эпитопов, рестриктируемых MHC I и II типа человека и мыши. К N-концу данного иммуногена был присоединен убиквитин, обеспечивающий его эффективный процессинг на протеасоме.

Одним из основных минусов ДНК-вакцин является их низкая иммуногенность [2]. Преодолеть ограничения иммуногенности конструкции было решено с помощью использования такого метода доставки, как струйная инжекция. Данный метод основан на введении препарата внутрикожно под высоким давлением, благодаря чему на клеточной мембране возникает напряжение сдвига, приводящее к ее дестабилизации и образованию временных пор, способствующих поглощению ДНК из межклеточного пространства [3]. Совместно с этим иммуногенность конструкции также повышается из-за наличия в коже большого количества антигенпрезентирующих клеток, способных активно процессировать и представлять антиген.

Цель данного исследования — изучить различные режимы иммунизации мышей линии BALB/c кандидатной ДНК-вакциной pBSI-COV-Ub, сочетающие в себе классическое внутримышечное введение и внутрикожное введение с использованием струйной инжекции.

Для экспериментов по оценке иммуногенности были взяты мыши линии BALB/c весом 20–23 г. Мышей иммунизировали с использованием различных режимов иммунизации, представленных в таблице. Кандидатная вакцина вводилась в дозе 100 мкг/50 мкл в случае струйной инжекции или в дозе 100 мкг/100 мкл в случае вну-

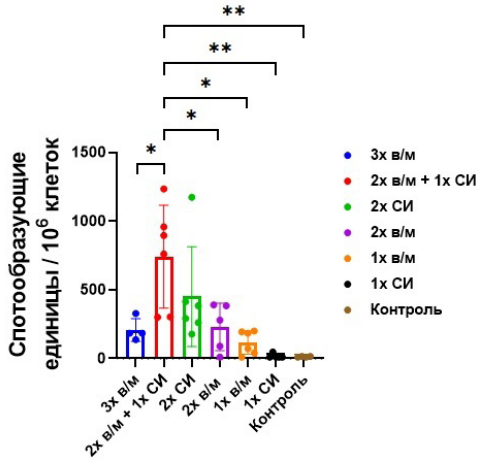
* Исследование выполнено в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

© В. А. Яковлев, М. Б. Боргоякова, Е. В. Тигеева, Д. Н. Кисаков, Л. А. Кисакова, Л. И. Карпенко, 2024

тримышечного введения шприцем. Через 2 недели после последней иммунизации осуществляли забор селезенок для анализа Т-клеточного ответа методом ELISpot.

Режимы иммунизации мышей

Номер группы	1	2	3	4	5	6
1 иммунизация	в/м	в/м	в/м	СИ	в/м	СИ
2 иммунизация	в/м	в/м	в/м	СИ	–	–
3 иммунизация	в/м	СИ	–	–	–	–



Количество спленоцитов, экспрессирующих IFNγ в ответ на стимуляцию пулом специфических пептидов, определенное методом ELISpot. Каждый столбик представляет собой среднее число клеток, образующих пятна, на миллион стимулированных спленоцитов (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

В результате было показано, что кандидатная ДНК вакцина обеспечивает формирование наиболее высокого уровня Т-клеточного ответа в группе, двукратно иммунизированной внутримышечно (в/м), с бустерной иммунизацией с использованием струйной инжекции (СИ) (среднее количество составило 830 SFUs (spot-forming units) на 10^6 спленоцитов), что было статистически выше, чем показатели группы с трехкратной в/м иммунизацией (338 SFUs) (см. рисунок). Также отмечалось, что различия между группами с двукратной в/м иммунизацией (254 SFUs) и двукратной иммунизацией СИ (451 SFUs) не были статистически значимы.

Таким образом, показано, что кандидатная ДНК-вакцина pBSI-COV-Ub обладает способностью индуцировать Т-клеточный иммунитет. Отмечалась тенденция к повышению количества SFU в группах, иммунизированных с применением струйной инжекции. При этом сочетание классического внутримышечного введения с бустерной иммунизацией с использованием СИ позволяет наиболее значительно увеличить иммунологические показатели.

Литература

1. Borgoyakova M. B., Volosnikova E. A., Ilyichev A. A., Karpenko L. I. Approaches to Improve the Immunogenicity of Plasmid DNA-Based Vaccines against COVID-19 // Genetics. Intech. Open. 2023.

2. Kisakov D. N., Antonets D. V., Shaburova E. V. et al. DNA Vaccine Encoding the Artificial T-Cell Polyepitope Immunogen of Tick-Borne Encephalitis Virus // Bulletin of experimental biology and medicine. 2023. Vol. 176. P. 72–76.

3. Sonoda J., Mizoguchi I., Inoue S. et al. A Promising Needle-Free Pyro-Drive Jet Injector for Augmentation of Immunity by Intradermal Injection as a Physical Adjuvant // International journal of molecular sciences. 2023. Vol. 24. 9094.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Agladze K. I. 263
Akhatova F. S. 580
Alaji M. 87
Alkhateeb R. 263
Arzamastsev G. F. 432
Awad M. S. 427
Bachkova I. K. 579
Bagryanskya E. G. 266
Barbaros M-M. A. 89
Basalova N. A. 581
Borodko D. D. 3
Bozdaganyan M. E. 264
Burskaya V. 10
Bushuev A. 10
Butuzova D. A. 581
Cartasev A. A. 89
Chernikov I. V. 579
Chernolovskaya E. L. 579
Danilenko D. M. 353
Danilushkina A. A. 580
Darwish A. 428
Dolgaya S. S. 94
Dubovichenko M. V. 435
Dubovskova S. D. 5
Efimenko A. Yu. 581
Efimenko B. 10
Egoraeva A. A. 582
Egorov V. V. 432
Eldeeb A. A. 87, 428, 430, 433, 435
Evdokimova O. L. 91
Fedin M. V. 268
Garmai Y. P. 432
Gasca V. A. 515
Gorokhova A. A. 92
Grudinina N. A. 432
Gunbin K. V. 10, 18
Guryanov I. D. 580
Guryev D. I. 8
Gusarov Y. 10
Hussein Z. 430
Ivashkevich D. N. 582
Ivontsin L. A. 12
Jdeed G. 13
Karpunina O. A. 91
Kirichenko T. 3
Kolokolov M. I. 268
Kolpashchikov D. M. 87, 430, 433, 435
Komissarov A. B. 353
Konstantinova I. D. 96
Krasnikov N. Y. 356
Krumkacheva O. A. 268
Kulebyakina M. A. 581
Kunina E. I. 266
Kuranova M. A. 92
Leonov S. V. 586
Li E. G. 91
Lobanova V. V. 15
Mahamat N. Y. 89
Mansour O. 353
Manzhulo I. V. 582
Manzhulo O. S. 582
Markov M. A. 437
Markov O. V. 427
Marusich E. I. 586
Mashkovtseva E. V. 12
Merkuryev A. V. 432
Meschaninova M. I. 579
Mikhaylova A. G. 10, 15
Mikheeva E. I. 92
Milovidov G. D. 16
Morozov A. N. 91
Morozova V. V. 13
Nartsissov Y. R. 12
Naumenko E. A. 580
Nbeaa A. 433
Neicovcena I. S. 89
Nemashkalov V. A. 16
Nnanyereugo V. O. 435
Nour M. A. Y. 433
Novikov M. A. 584
Odarenko K. V. 437
Omelchenko A. V. 3
Orekhov P. S. 264
Pervoykina K. A. 439
Pleshko E. M. 3
Podarov R. A. 268
Ponomarenko A. I. 582
Popadin K. Y. 10, 15, 18
Potapova N. A. 18
Prusakov R. Z. 439
Ree N. A. 18
Romanova S. A. 263
Romanovskaya K. S. 93
Rykova V. S. 356
Sachanka A. B. 94
Salimon S. S. 586
Savin I. A. 579
Semidetnov I. S. 263
Sen'kova A. V. 579
Shalaev A. 87
Shchur V. V. 94
Shernyukov A. V. 266
Slotvitsky M. M. 263
Smirnova O. S. 96
Sukhorukov V. N. 3
Tikhomirova T. S. 16
Tikunova N. V. 13
Tretyakov E. V. 268
Tsvelaya V. A. 263
Tyrtyshnaia A. A. 582
Ugriumov V. S. 439
Usanov S. A. 94
Vakhtinskii V. M. 439
Van Leiden N. S. 18
Verbilo K. M. 8
Vlassov V. V. 579
Yantsevich A. V. 94
Yudkina A. V. 266
Yuzhakov A. G. 356
Zabrodskaya Y. A. 432
Zamyatin A. A. 5
Zenkova M. A. 427, 437, 579
Zharkov D. O. 266
Zuraev A. V. 8

Абаева М. Р. 441
Абашкин В. М. 270
Абдулкадиева М. М. 588
Абдуллина М. И. 331
Абрамова О. В. 412, 690, 724
Абубакирова Э. А. 591
Абышев А. А. 686
Авраменко А. А. 484
Агабалаев Д. Н. 50
Агафонов М. О. 511
Агеенко А. Б. 593
Агладзе К. И. 272, 321, 325, 340, 499, 615, 706
Аглетдинов М. Р. 50, 402
Аглетдинов Э. Ф. 360
Аглиуллина Д. Р. 238
Аитова А. А. 272, 291, 340, 499, 615, 706

Айриянц К. А. 497
Акимкин В. Г. 50, 402
Аксенов-Грибанов Д. В. 38, 113, 219, 248
Акуневич А. А. 19
Аладьев С. Д. 595
Александрова Э. П. 307
Алексеев А. Ю. 704
Алексеева Л. А. 564, 597
Алексеева Ю. С. 696
Алешкин А. В. 404
Алимова А. Р. 358
Алмежанова М. Д. 441
Алрхмун С. 21, 62, 68, 443, 599, 726
Алсаллум А. 443, 599, 726
Алферов С. В. 225
Альшевская А. А. 21
Амансахатова Е. Н. 601
Андреенкова О. В. 575
Антимонова А. А. 573
Антипова Т. В. 708
Антифеева И. А. 60
Антосюк О. Н. 684
Анурова М. Н. 404
Апарцева Н. Е. 658
Аралов А. В. 309, 555
Артюхов В. Г. 348
Архипенко М. В. 421
Архипов И. А. 200
Аршинцева Е. В. 276
Асадуллин А. Р. 621
Астахов Н. С. 317
Астрелина П. С. 97
Асякина А. С. 604
Асякина Л. К. 103
Аулова К. С. 606
Афанасьева А. А. 99
Афоничева К. В. 445, 520
Ахметова А. Р. 362
Ахметова Е. А. 621
Бабаев А. А. 479
Бабаев М. А. 714
Бабкин И. В. 538
Бадамшин Э. А. 23, 78
Байдакова Г. В. 611, 613
Байков И. К. 400
Байрамова С. А. 190
Байрамова С. П. 26
Байрамуков В. Ю. 350
Бакуменко С. С. 272
Балалаева И. В. 280
Баландина С. Э. 608
Баракова Н. В. 223
Баранова О. А. 137, 153, 258
Бардина М. В. 175
Барыгин О. И. 481, 648
Барыкин Е. П. 724
Басина В. П. 688
Баталова А. А. 248
Бауэр И. А. 447
Башарова К. С. 611, 613
Башева А. И. 347
Башкина Е. С. 107
Баюрова Е. О. 477
Баяндин Р. Б. 387
Безрукова А. И. 611, 613
Беленькая С. В. 379
Белов А. К. 181
Беловежец Т. Н. 133
Белышенко А. Ю. 219, 248
Белько Н. В. 295
Беляева С. В. 608
Бердиева С. Б. 360
Бережной А. К. 272, 321, 325, 344, 615
Березина О. Я. 274
Березкина М. Э. 449
Березова К. А. 186
Березянко И. А. 712
Бидюк В. А. 511
Биккузин Т. И. 101, 743
Блинов А. А. 198
Бобрик Д. В. 621
Боброва Л. А. 451
Бобровских М. А. 575
Богачёва Н. Н. 103
Богданович В. А. 313
Богданов М. В. 494
Богомолов М. А. 515
Богословская Е. В. 398
Богрянцева М. П. 107
Боднев С. А. 396
Боева О. С. 617, 619
Болотова В. Ц. 696
Бондарева Е. А. 674
Бондарь Н. П. 497
Бопи А. К. 441
Боргоякова М. Б. 667, 722, 745
Борисевич В. И. 619
Борисова Н. И. 50
Боровикова И. И. 45
Бородина Е. Е. 103
Бородко Д. Д. 66, 71
Бородулина И. А. 676
Бошляков Г. С. 105
Браже Н. А. 323
Брезгин С. А. 151, 221, 477
Брит П. И. 621
Бродская А. В. 362
Брызгунова О. Е. 741
Бубнов Д. М. 192
Буздин А. А. 515
Булатова Л. Ф. 494
Булатова М. В. 107
Булина Н. В. 676
Бунева В. Н. 621
Буренина О. Ю. 553
Бурлаков Е. В. 85
Бурлаковский М. С. 238
Бурмистрова Н. А. 144
Бурылова А. Л. 454
Бухарина А. Ю. 50, 402
Бухарова Т. Б. 688
Бухвостов А. А. 625
Бушина Л. Г. 495
Бывакина А. А. 593
Быков А. С. 276
Бычкова А. В. 331
Бычкова Т. М. 311
Валиахметова Э. Р. 456
Валихов М. П. 412, 724
Ванеев А. Н. 724
Ванин А. Ф. 334
Вансович А. С. 198
Варакина-Митрай К. А. 196
Вареха Н. В. 196
Варламова Н. В. 131
Вартанова Е. О. 416
Варфоломеева Е. Ю. 350
Василевский В. В. 381
Васильев А. В. 27, 30, 688, 80
Васильев Г. В. 575
Васильева Н. С. 593
Васиховская В. А. 360
Васюкова А. А. 412
Вахрушев Н. С. 623
Веденкин А. С. 625
Ведерникова В. О. 458
Величко А. А. 109
Веснина А. Д. 111
Ветрова А. Н. 364
Вечкапова С. О. 542
Виноградов М. В. 149
Виноходов Д. О. 449
Владимиров Г. К. 58
Власенко Н. В. 366
Власова А. А. 113, 219
Власова А. В. 385
Воинова Т. М. 233, 250
Воловиков Е. А. 175
Володин В. В. 477
Володяев И. В. 58
Волынец М. О. 21, 62, 68, 443, 599, 726
Воронежская В. С. 27, 30, 80
Воронина Д. В. 198
Воронина Д. Г. 115
Воронина Е. В. 181
Воронина Е. Н. 190
Воронова А. Д. 730
Ворошнина А. А. 337
Выборная Т. В. 192
Выходцева А. В. 50

Вьюшков В. С. 459, 534
Гаврилова А. А. 305, 461
Гавриш М. С. 479, 536
Галаутдинов М. Ф. 101
Галимова А. Р. 149
Ганцова Е. А. 463
Гарсия К. 190
Гаспарян М. Э. 665
Гатаулина Э. Д. 278
Гвоздев В. А. 558
Генералов Е. А. 117
Генералова Л. В. 117
Герасимов О. А. 495
Гербст А. Г. 119
Герцен М. М. 121
Гефтер С. Д. 280
Гешко С. А. 394
Гизатулин Р. Ф. 101
Гимадиев Р. Р. 196
Глаголева Е. В. 233, 250
Глазкова Д. В. 398
Глебов С. Н. 32
Глебова А. Е. 75
Глинская Е. В. 124
Глумакова К. А. 465
Глущенко А. В. 371
Глущенко А. Г. 366
Говорун В. М. 566
Гоглев А. В. 34
Головачева У. Е. 627
Головкин И. О. 629
Голосова Н. Н. 467
Голубев Д. М. 124
Голубева Е. Н. 712
Голышев В. М. 303
Гольдштейн Д. В. 215, 688
Гончаров С. Е. 50
Горбач А. В. 469, 561
Горбунова Е. А. 126
Гордеева Т. Л. 236
Гордейчук И. В. 477
Горобец М. Г. 331
Горская А. В. 631
Горчаков В. Н. 601
Горшкова Ю. Е. 350
Гостева Т. А. 368
Готовцев Р. А. 653
Градова М. А. 331
Грановский Д. Л. 421
Грачева А. В. 362
Гречкин А. Н. 549
Григорьев С. В. 350
Григорьева Э. В. 595
Григорян И. В. 157
Гринь О. О. 714
Грифлюк А. В. 633
Гришина Е. В. 105
Грунтенко Н. Е. 36, 575
Грюк А. О. 181
Грядунов Д. А. 490
Грязнова М. О. 643
Гунбин К. В. 23, 78
Гуницева Н. М. 471
Гурина О. И. 690, 724
Гурьев А. А. 473
Гусев А. И. 499
Гусев И. А. 635
Гусева Е. А. 555
Гусельникова В. В. 637
Даминов А. С. 246
Данильченко В. Ю. 639
Данковцева Е. Н. 45
Дарнотук Е. С. 258
Дворецкая В. А. 128
Дедков В. Г. 423, 492
Деев И. Е. 463
Дейкин А. В. 115
Демиденко Д. В. 131
Демин А. Г. 321, 615
Демина Д. С. 360
Демкин О. В. 299
Денисов С. В. 23, 78
Денисова В. В. 68
Дергачева Н. И. 641
Деревянко А. О. 416
Деркаев А. А. 198
Дерюженко М. А. 36, 575
Десюкевич П. Ю. 133
Дёмина А. В. 643
Дёрко А. А. 371
Джабраилов В. Д. 291, 706
Джавахия В. В. 233, 250
Джазули Р. 362
Джалилова Д. Ш. 522, 714
Джонсон М. 190
Дзагурова Т. К. 364
Диатроптова М. Н. 528
Диброва Д. В. 53
Диваева Л. Н. 648
Дивашук М. Г. 27, 80
Диеспиров Г. П. 646
Димитров В. О. 196
Дмитриева А. Р. 30
Дмитриева М. Е. 38, 248
Дмитриенко Е. В. 447, 694
Добыш О. И. 40
Довгий М. А. 198
Додина М. С. 392
Долгих Д. А. 665
Долгова А. С. 423, 492
Домашева О. Ю. 495
Донцова О. А. 553
Доронина Н. В. 256
Дронь М. Ю. 648
Дубенская Н. А. 283
Дубова В. И. 75
Дубовицкий Н. А. 371
Дудник Д. Е. 135
Дунаев Я. Д. 43
Дюйзен И. В. 660
Евланенков К. К. 475
Евменов К. С. 477
Евсеев А. П. 307
Евстратова А. Ю. 137
Евсютина Д. В. 566
Евтеева М. А. 471
Евтушенко Д. Н. 734
Евтушенко Е. А. 414, 421
Егораева А. А. 651
Егоров А. Е. 276
Егоров А. Н. 653
Егоров К. С. 48
Егорова А. И. 139
Егорова А. М. 549
Егорова М. С. 364
Егорова Т. В. 175
Елисеева Е. В. 244
Елистратов Д. Г. 698
Елшин И. А. 166
Ельчанинов А. В. 463
Емельянова Л. А. 467
Ендуткин А. В. 544
Епанчинцева А. В. 126
Ермаков Е. А. 621
Ермакова М. Ю. 373
Ермолаев А. С. 30, 27, 80
Ермошина А. А. 479
Ерохова П. И. 274
Ершова Н. М. 358, 573
Есаулкова Я. Л. 375
Есмагамбетов И. Б. 198
Ефименко Б. Э. 78
Ефимушкина А. С. 528
Ефремов И. С. 621
Ефремов Ю. М. 280, 712
Жарков Д. О. 544
Жарков Т. Д. 447
Железнова А. С. 377, 410
Жигулин А. С. 481
Житкевич А. Ю. 477
Жогла В. А. 270
Жуков С. А. 447
Жукова Г. В. 315
Жукова Ю. В. 21
Жунусов Н. С. 484
Жупикова О. А. 379
Забелина Д. С. 360
Заварыкина А. В. 540
Завьялов Е. Л. 599, 726
Зайковская А. В. 379, 396
Зайнутдинов С. С. 396
Зайцев А. В. 633, 643, 646, 732
Зайцева А. Ю. 32

Закуражная В. И.....655, 690
Замятин В. И. 45
Замятнин А. А. 221
Зарубаев В. В.....375, 379
Заседателева О. А. 254
Затейщиков Д. А. 45
Захарова Е. Ю. 611, 613
Захарова М. В.....732
Захлевная Д. А. 696
Зверева М. Э.....553
Звонарев А. Н.....227
Земскова М. Ю.....451, 708
Зиганшина С. Е. 160
Зобова Е. В. 45
Золин В. В. 368
Золотарев А. А. 299, 700, 734
Золотарева М. С. 105
Золотцев В. А. 331
Зоркина Я. А. 690, 724
Зубанова Е. М.....712
Зубарева О. Е.....329, 732
Зубенко А. А.....648
Зубков Е. А. 690, 724
Зубов А. Г. 321
Зыкова М. А.....47
Зыцарь М. В. 639
Ибадуллаева Н. С.....360
Иваненко К. А. 486
Иванов А. В. 379
Иванов Д. В. 601
Иванов С. В. 373
Иванова А. А. 285, 658
Иванова А. К. 137
Иванова Ю. В. 658
Ивашкевич Д. Н. 651, 660
Иващенко И. А. 381
Ивин Ю. Ю.....416
Игнатов А. Н. 141
Игнатьев-Качан А. О. 270
Иерусалимский Н. В.....662
Ильичев А. А.....667
Ильичева П. М. 144
Ильчибаева Т. В.....702
Иминова Л. Р. 145
Иншакова А. М. 153, 258
Ионов Я. А.....147
Иркитова А. Н. 135
Исабек А. У.....441
Исаев Н. Р. 664
Исакова А. А. 665
Исакова-Сивак И. Н.....408
Исхакова Э. Р. 487
Кабилов М. Р. 371
Казакова А. В. 97
Казакова О. Б.....261
Казанцева О. А. 501
Казаринов К. Д.....258
Калганова А. И.....287
Каленов С. В. 164, 202
Калинин А. Г. 383
Калинин А. И. 615
Калинина Е. Н. 160
Калинина О. В.....623
Калинкин Д. Е. 720
Камалов М. Н. 410
Камараули Е. Д.....385
Камарова К. А. 358, 573
Камзеева П. Н.....555
Камолходжаев Д. А.....360
Канарская М. А. 289
Кандинов И. Д.....490
Каночкина М. С. 149
Капаруллина Е. Н.....256
Капитонова М. А.....492
Капрельянц А. С. 295
Карандашов И. В. 151, 477
Карелина К. В. 387
Каримова Е. Д. 662
Карпенко Л. И. 509, 667, 722, 745
Карпов А. А. 623
Карпов М. А. 686
Карпова Е. В.....390
Карпова О. В. 414, 421
Карпушин М. Ю. 280
Карсунцева Е. К. 730
Карташов М. Ю. 377, 410
Каршиева С. Ш. 730
Кастюкевич Л. И. 469
Качуляк Д. А.....254
Каширина А. П.....658
Кельциева О. А. 99
Кечин А. А. 507
Килунов А. В.....494
Кильмухаметов Ф. Ф. 101
Кильчевский А. В.....469, 561
Киреев Ф. Д. 21
Кирик О. В.....637
Кириллова В. С. 615
Киров И. В. 385, 526
Кисаков Д. Н. 667, 722, 745
Кисакова Л. А. 509, 667, 722, 745
Киселева Д. Г.....291
Киселёва И. В.....394
Киямова Р. Г.....494
Клименко А. И. 575
Кличханов Н. К. 567
Кобякова М. И. 669
Ковалев Р. А.....350
Ковалева А. А. 225
Коваленко С. Г. 293, 301, 340
Коваль О. А. 447
Кожабергенов Н. С. 441
Кожевникова Е. Н. 135
Козлов В. А.....617
Козлов И. Б. 495
Козлова О. А.....153, 258
Козловская Л. И. 390, 392, 425
Козобкова Н. В. 295
Кокоулин М. С.....155
Колесник И. А. 379
Колесникова М. М. 497
Колмогоров И. М. 157
Колоколов М. И.....342
Колосов П. В. 166, 260, 671
Колосова Е. А. 166, 513, 671
Колосова Н. Г. 327
Колотаев А. В. 331
Комарова Л. Н. 56, 172
Комарова М. В.....710
Комарова Т. В. 358, 573
Комиссаров А. Б.....394
Кондакова О. А. 421
Кондратьева Л. Г. 179
Коновалова Е. А. 160
Кононова Д. В. 499, 706
Коношенкова А. В.....53
Коношенко М. Ю. 741
Копеин Д. С. 456
Копосова О. Н. 501
Копылова А. А. 223
Копытова А. Э. 611
Коренская А. Е. 575
Коржанова М. 394
Коржевский Д. Э. 637
Корзун И. А. 48
Кормщикова Е. С. 160
Коробейникова А. С. 124
Корокин М. В. 115
Короткова И. А. 381
Корчевая Е. Р. 362
Корякин С. Н. 276
Косарев Ю. А. 503
Косова А. М.....698
Костюк С. В.....712
Костюшев Д. С. 151, 221, 477
Костюшева А. П. 151, 221, 477
Косырева А. М. 528
Котов И. А. 50
Котова М. В. 686
Кочнева Г. В.....396
Кошпаева Е. С. 569
Кравцов Д. В. 490, 504
Кравченко С. В. 162
Кравчук Б. И. 467, 507
Красильникова А. А. 392
Красицкая В. В. 184
Красникова С. И. 509
Краснов В. П. 375
Краснов К. С. 669
Краснова Т. С. 524
Крицкая К. А. 117
Крумкачева О. А. 342
Кручинина М. В. 658
Ксенафонтов А. Д. 394

Ксенева С. И. 700
Кубышкин А. В. 716
Кудров Г. А. 396
Кузнецов А. В. 313
Кузнецов Д. А. 625
Кузнецов Н. А. 503
Кузнецова А. А. 503
Кузнецова И. М. 60, 305, 319, 532
Кузьменко Т. П. 540
Кузьминкова А. А. 471
Кузьмицкая А. А. 164
Кузьмич А. С. 155
Кукина Т. П. 166
Кулаков А. А. 688
Кулакова М. В. 511
Кулигина Е. В. 593
Куликов В. В. 513
Купрюшкин М. С. 447
Купцова П. С. 56, 172
Курашова С. С. 364
Курбатова А. А. 484
Курилин В. В. 443, 599, 726, 728
Курилович С. А. 658
Кускова И. С. 205
Кутырев И. А. 53
Кутырева Л. И. 53
Куцерубова Н. С. 107
Кушакова Д. Ш. 360
Кушнир С. А. 484
Лавров С. А. 558
Лаврова Д. Г. 227
Лаврова Т. В. 168
Лазаревич Н. Л. 553
Лаишевцев А. И. 404
Лактионов П. П. 741
Ланцова Е. А. 170
Ланцова Н. В. 549
Лапа С. А. 252
Лапенко А. К. 56, 172
Лапочкина И. Ф. 27
Лапшина К. К. 297
Ларкин А. А. 490
Ларюшкин Д. П. 117
Ле-Дейген И. М. 157
Лебедев П. Р. 484
Лебедев Т. Д. 486, 515, 530
Левченко А. А. 58
Левченко И. Н. 58
Левчук О. Д. 173
Леконцева Н. В. 551
Леонов С. В. 337
Лиознов Д. А. 394
Липатова О. Е. 113, 219
Листопад А. С. 219, 248
Литвиненко В. В. 588
Литвинова Н. А. 456
Лобанова А. О. 299
Лобанова В. В. 78
Логинова А. М. 371
Ломзов А. А. 289, 303, 309, 346
Ломов Н. А. 459, 534
Ломовская Я. В. 669
Лопатникова Ю. А. 21, 443, 599, 726
Луговский А. П. 295
Лунев Е. А. 175
Лутова Л. А. 238
Лысакова В. С. 177
Львова И. Д. 517, 571
Любушкина Е. М. 674
Лямина Ю. В. 32
Ляпунова Е. Р. 56
Ляхова А. Н. 684
Ляшков П. О. 274
Мазинг М. С. 32
Мазуркова Н. А. 406
Макалиш Т. П. 629
Макаревич Е. В. 406
Макарова О. В. 522, 714
Макарова С. В. 676
Макарченко Р. К. 553
Макашов А. А. 47
Макашова В. В. 366
Макеев М. А. 678, 692
Маковеева Е. В. 64
Максимов В. И. 186
Максимов В. Н. 658
Максимов Г. В. 221, 323
Малкова А. В. 135
Мальцев Д. В. 648
Маляровская В. И. 231, 577
Манжуло И. В. 651, 660
Марасаева Е. А. 680, 718
Маренина М. К. 379
Маркин А. М. 291
Марков А. Г. 664
Марков О. В. 564
Маркова А. Ю. 179
Мартюшова В. Г. 519
Марченко И. В. 445, 520
Марченко О. М. 307
Марченко Р. Д. 205
Марыгин Р. А. 181
Маслов Д. Е. 360
Маслова Г. В. 629
Маслова Е. А. 639
Матвеев А. Л. 467, 507
Матвиенко Е. В. 141
Матюшенко А. М. 297
Махаева К. Е. 43, 210
Маяк М. А. 522
Меглей А. Ю. 688
Медков М. А. 244
Межлумян Е. В. 497
Меламуд М. М. 621
Мелисбек А. М. 441
Мелконян К. И. 604
Мельникова А. И. 524
Менчинская Е. С. 454, 682
Меркулов П. Ю. 526
Меркулова М. С. 416
Мешкова Ю. В. 379
Микушин П. В. 43, 75, 210
Миллер Р. 190
Миловидов Г. Д. 109
Милюхина И. В. 611, 613
Минтаев Р. Р. 398
Миронов А. В. 688
Миронова Е. М. 181
Миронова Н. Л. 564, 597
Мирошниченко Е. А. 528
Мирошниченко С. М. 686
Митькевич В. А. 724
Мифтахова А. Т. 301
Михайлова Е. Е. 400
Михаленко Е. П. 469, 561
Михальский М. Г. 379
Михеева А. М. 515, 530
Мишарина Е. А. 219
Моисеева А. А. 119
Моисеева Е. О. 182
Мокин Я. И. 60, 461
Мокроусов А. Д. 684
Молев С. В. 192
Молчанов И. Д. 540
Молчанов С. Г. 276
Моргунова М. М. 113, 219
Морозова А. Ю. 690, 724
Морозова Е. П. 184
Морозова Ф. В. 303
Мосалев К. И. 686
Московский А. А. 311
Моторина А. О. 479
Музурова В. В. 408
Мукминов М. Н. 242
Мурашкина Т. А. 371
Мурина Е. А. 741
Мусабаев Э. И. 360
Мясников Б. П. 555
Набиев С. Р. 297
Надтока М. И. 50, 402
Назарова Е. А. 147
Назаров К. В. 62, 443
Наквасина М. А. 317
Науменко В. С. 702
Наумов В. Д. 272, 344, 615
Наумов С. С. 734
Невинский Г. А. 606, 621
Неделяев Е. М. 305
Недорубова И. А. 688
Неклесова М. В. 532
Некрасова Е. И. 334
Немашкалов В. А. 109
Немцова Е. Г. 658

Нетёсов С. В. 360
Нефёдова В. В. 297
Нечаев В. Н. 124
Нечаева И. А. 82
Нечаева О. В. 124
Нешев Н. И. 283
Низовцева И. Г. 43, 75, 210
Никанова Л. А. 186
Никитенко О. В. 311
Никитин Н. А. 414, 421
Никитина И. А. 637
Никишина М. А. 64, 210
Николаев М. А. 611
Николаев М. В. 278
Николаев Н. А. 534
Николаева Л. И. 213
Никонов С. Д. 735
Никулин А. Д. 551
Никулин Д. А. 45
Нимаев В. В. 735
Нисканен С. А. 449
Нифонтова Г. О. 712
Носков Я. А. 32
Нуштаева А. А. 593
Овчинников В. С. 704
Овчинников М. А. 307
Окатова А. С. 549
Оковитый С. В. 696
Окулова Е. С. 238
Ольховая Е. Р. 56, 172
Омельченко А. В. 66, 71
Орехов А. Н. 718
Орехов Н. А. 66, 71
Орищенко К. Е. 639
Орлова О. В. 398
Осипов И. Д. 360
Остальцев И. А. 741
Остапчук А. В. 381
Оськина О. П. 368
Охальников А. Д. 479, 536
Охрименко Г. С. 45
Очнева А. Г. 690, 724
Павлова А. Ю. 223
Павлова В. С. 637
Падкина М. В. 238
Пайбердин А. О. 105
Пак Д. В. 105
Пак И. А. 190
Пак С. В. 741
Панина Е. А. 538, 639
Панкратов В. С. 58
Панова А. Е. 381
Пантина Р. А. 350
Паравина Е. В. 678, 692
Паришина Е. Ю. 221
Пархаева А. П. 307
Парчайкина М. В. 540
Паршин Д. А. 615
Пасивкина М. А. 404
Пастухова Н. Д. 34
Паткин Е. Л. 641
Патраханов Е. А. 115
Пахомова М. Д. 511
Пашкина Е. А. 617, 619
Пашковский С. Е. 387
Перевозчиков Д. В. 385
Переломов Л. В. 121
Пересадина А. В. 50, 402
Перик-Заводская О. Ю. 21, 62, 68, 443, 599, 726
Перик-Заводский Р. Ю. 21, 62, 68, 443, 599, 726
Петров Г. А. 526
Петрова А. А. 188
Петрова А. М. 105
Пиденко П. С. 144
Пилявский Н. Н. 629
Пимкина Е. В. 50
Пипия С. О. 287
Пислягин Е. А. 682
Плешко Е. М. 66, 71
Плюснина Т. Ю. 291
Поварова О. И. 60
Подольская Е. П. 99
Покровский В. М. 115
Покровский М. В. 484
Покушалов Е. А. 190
Политов А. А. 337
Половкова О. Г. 410
Поляков А. С. 32
Пономарева Н. И. 151, 221, 477
Пономаренко А. В. 190
Пономаренко А. И. 651, 660
Пономаренко Е. А. 181
Попадьин К. Ю. 23, 78
Попинако А. В. 53
Попов В. К. 688
Попов С. В. 175
Попова В. К. 694
Попцова М. С. 45
Поспелов А. Д. 280
Постникова Т. Ю. 633, 646
Посух О. Л. 639
Потапова Н. А. 38
Поткин В. И. 379
Поттер И. А. 47
Прасолов В. С. 458, 465, 486, 515, 530
Привалова А. А. 192
Приходько В. А. 696
Прокопенко П. И. 408
Прокудин А. В. 371
Пронькина А. А. 698
Просеков А. Ю. 111
Проскура А. Л. 542
Проценко М. А. 406
Психа Б. Л. 283
Путинцева О. В. 348
Пушкаревская А. А. 309
Пушкин С. Ю. 276
Пчелина С. Н. 611, 613
Пшеничкина Ю. А. 406
Пшеничный К. А. 350
Пыхтина М. Б. 686
Пыхтунова Е. А. 700
Пьянков О. В. 379, 396
Радченко Н. С. 702
Разенкова В. А. 637
Разумов И. А. 737
Рак А. Я. 408
Рахматуллин Ш. Р. 101
Ребик А. А. 73
Ревин В. В. 540
Ревина Э. С. 540
Резайкин А. В. 75
Ренфельд Ж. В. 708
Решетникова Д. Д. 494
Риппинен Д. В. 194, 704
Рихтер В. А. 593
Робустова С. Д. 499, 706
Рогова А. 362
Родин В. А. 553
Родионов Е. М. 105
Роев Г. В. 50, 402
Роман С. Г. 297
Романенко Л. А. 155
Романова О. Н. 469
Романова С. А. 272, 325, 340
Романовская К. С. 202
Ромодин Л. А. 311
Росина Е. В. 160
Рубцов М. А. 459
Рубцов П. М. 524
Рубцова М. П. 553
Руденко Л. Г. 408
Руденок М. М. 613
Рудометов А. П. 667, 722
Рудометова Н. Б. 722
Рузметова С. И. 360
Русина Д. С. 196
Рысцов Г. К. 708
Рябова Е. И. 198
Рябчевская Е. М. 414, 421
Сабуцкий Ю. Е. 454
Саввина М. Т. 473
Савин И. А. 564
Савицкий А. П. 295, 347
Савицкий М. А. 313
Саенко В. В. 50
Сазонова О. С. 200
Сакаян Д. И. 202
Саковина Л. В. 544
Салахутдинов Н. Ф. 379
Салихова Д. И. 215

Салищева О. В. 188
Саллум Г. 741
Сальников В. В. 569
Сальседо М. Р. К. 315
Самотаева И. С. 662
Самцов М. П. 295
Санникова Н. Э. 342
Сапунова Л. И. 173
Сараджи Н. Г. 317
Сараев Г. И. 205
Саргсян К. Т. 710
Сасина Л. К. 641
Сафарян С. М. 712
Светличный Д. В. 50
Свирин К. А. 377, 410
Седых С. Е. 519
Селиванов А. С. 615
Селиванов П. А. 208
Селина П. И. 545
Семейкина А. А. 119
Семенов В. Г. 128
Семенцов М. В. 515
Семидетнов И. С. 272, 344
Сенатов Ф. С. 730
Сенников С. В. 21, 62, 68, 443, 599, 726, 728
Сенотов А. С. 669
Сенькова А. В. 564
Серазетдинова Ю. Р. 103
Серганова М. А. 526
Сергеев В. Г. 139
Сергеева Т. О. 325
Сергиев П. В. 555
Серегин Ю. А. 181
Сивицкая Н. А. 21
Сидоренко Д. А. 517, 571
Силачев Д. Н. 215
Силина М. В. 714
Силков А. Н. 443, 599, 726
Силонов С. А. 305, 319, 532
Сильченко А. С. 682
Симакова М. А. 540
Симоненко Е. Ю. 285, 307
Синеокий С. П. 192, 236
Синицына А. П. 321, 344, 615
Синников К. А. 252
Синюгина А. А. 373
Синяк Д. С. 732
Ситяева Д. В. 547
Скорупо А. С. 704
Скрипова В. С. 494
Скуднов А. В. 23, 78
Слатинская О. В. 221, 323
Слесарев О. В. 710
Сломинский П. А. 613
Слонова Д. А. 588
Слотвицкий М. М. 272, 321, 325, 340, 344, 499, 615
Смаглий Л. В. 720
Смирнов Е. Ю. 305, 319, 532
Смирнов И. В. 287
Смирнова Д. И. 362
Смирнова Е. О. 549
Смоленцев А. А. 327
Смольникова М. В. 445, 520
Смольянова Н. А. 551
Смыслов А. Д. 553
Снитко П. Ф. 456
Снытникова О. А. 327
Собенин И. А. 718
Собянин К. А. 588
Соколов Д. К. 595
Соколова Е. А. 190
Соколова Е. М. 283
Соколова Л. О. 348
Соколова М. О. 137
Сокольская С. Я. 555
Солдатова М. С. 674
Соловьев И. Д. 347
Соловьева А. О. 194, 704
Соловьева И. М. 704
Соловьева О. И. 599, 726
Соловьева Э. Ю. 137, 153, 258
Солодкий В. В. 368
Солодков П. П. 133
Солодовников А. А. 558
Сорокина Л. Е. 716
Сорокоумов Е. Д. 542
Сосновцева А. О. 412
Сотченко Д. Ю. 30
Спасов А. А. 648
Спирин П. В. 458, 465, 515
Станкевич Ю. С. 561
Стародумов И. О. 43, 210
Старостина Е. В. 667, 722
Сташкевич Д. С. 591, 608, 739
Степаненко А. А. 412, 730
Степанова А. А. 192
Степанова Л. В. 315
Степанова О. В. 730
Стефанова Н. А. 547
Стовбун С. В. 625
Столярчук Н. М. 313
Строкотова А. В. 595
Стучинская М. Д. 213
Субханкулов М. Р. 329
Суворова И. И. 487
Судьина А. К. 215
Сулейманов Ш. К. 21
Султанкулова К. Т. 441
Сунбули Х. 564
Сурин А. М. 532
Суркова Р. С. 718
Сухих И. С. 423
Сучкова И. О. 641
Сушкова Д. Н. 115
Съедина Н. М. 27, 30, 80
Сыровнев В. А. 615
Сысолятина Е. В. 588
Сычев К. В. 569
Тарасов Д. С. 295
Тарасова Д. А. 217
Тареева Е. А. 337
Таробыкин В. С. 536
Тахауов А. Р. 720
Тахауова Л. Р. 720
Телегина Д. В. 327
Телышев Д. В. 664
Тельнова Т. Ю. 113, 219
Теплова П. О. 276
Терехов С. С. 287
Терновой В. А. 387
Тигеева Е. В. 667, 722, 745
Тикунова Н. В. 400, 467, 507, 538
Тимашев П. С. 712
Тимофеева А. М. 519
Тимофеева Н. А. 503
Тимошенко В. А. 157
Тимченко М. А. 276
Тихонов А. С. 151, 221, 477
Товпеко Д. В. 137
Топоркова Я. Ю. 549
Торопов С. Е. 414
Торопова А. В. 223
Торопцева А. В. 331
Тощаков С. В. 27, 30, 80
Трифанова Е. М. 688
Трифонова Н. Е. 334
Троев И. П. 653
Тронов В. А. 334
Трушина Д. Б. 280
Тряхов Д. Е. 337
Туроверов К. К. 60, 305, 319, 532
Турчанинова Е. А. 291, 340, 706
Тутукова С. А. 536
Тыганов С. А. 517, 571
Удут В. В. 700
Удут Е. В. 734
Укубаева Д. Г. 418
Ульянкин Д. А. 208
Ульянов Д. С. 27, 30, 80
Урусов Ф. А. 398
Усенко Т. С. 611, 613
Усова С. В. 107
Ушакова В. М. 690, 724
Фаворская И. А. 198
Фадеев А. В. 394
Фадеев Р. С. 669
Файзулоев Е. Б. 362
Фасхутдинова Е. Р. 103
Федин А. И. 137, 153, 258
Федина В. В. 225
Федорец В. А. 538
Федорова Е. А. 637

Федорова Е. С. 410
Федорова Н. Д. 350
Федосеева Д. М. 495
Федотов П. А. 208
Федотов С. П. 64
Федотова О. С. 381
Фетисова Е. И. 669
Филатова А. А. 597
Филиппова А. С. 82
Филиппова Е. И. 406
Филиппова Е. С. 227
Филиппова Ю. Г. 443, 599, 726
Фильштейн А. П. 155
Фисунов Г. Ю. 566
Фишер М. С. 443, 726, 728, 599
Фомина А. А. 229
Фомочкина И. И. 716
Фонин А. В. 60, 305, 319, 461, 532
Фотина Н. В. 103
Франк Л. А. 184
Фрейнкман О. В. 147
Фролова А. С. 151, 221
Фролова Ш. Р. 293, 301
Фурса Г. А. 730
Хабибуллин Н. Р. 416
Халилуев М. Р. 131
Халимов Р. И. 678, 692
Харисова А. Р. 732
Харькова А. С. 168
Хасанов Д. Г. 147
Хафизов К. Ф. 50, 366, 402
Хачатрян Д. С. 331
Хвостов М. В. 379, 676
Хикматуллаева А. С. 360
Хлусевич Я. А. 467, 507
Хлынова Т. А. 342
Хозов А. А. 192
Хоссаин Р. М. 198
Хохлачев Н. С. 202
Хохлова Д. М. 362
Храмова Е. П. 406
Храпунова Д. Р. 418
Хрусталёв В. В. 19
Худайназарова Н. Ш. 421
Царь А. И. 40
Цатурян Г. А. 231
Цвелая В. А. 272, 291, 321, 325, 340, 344, 499, 615, 706
Цейликман Д.-М. В. 85
Центалович Ю. П. 327
Цой Е. А. 566
Цуран Д. В. 734
Цурина А. М. 655
Цыганов В. А. 233
Чадин А. В. 730
Чалабов Ш. И. 567
Чанышев М. Д. 50, 366
Чеботарев Д. В. 346
Чеканов А. В. 137, 153, 258
Чепурко В. Г. 236
Черенков И. А. 217
Черненко И. Н. 244
Чернов К. П. 238
Черномырдина В. О. 688
Чернопятов Д. И. 735
Чернышева А. А. 412
Чернышёв В. С. 182
Чернышова Д. О. 449
Чехонин В. П. 412, 724, 730
Чечкова Н. А. 240
Чжэн Вэньцзин 737
Чигирева А. А. 75
Чикаев А. Н. 133
Чингизова Е. А. 682
Чиркова П. А. 252
Чичерина Г. С. 507
Чудайкина Е. В. 540
Чудинов А. В. 252, 254
Чудновец Т. А. 172
Чуланов В. П. 151, 221, 477
Чумачёва Ю. В. 739
Чуркин М. И. 166
Шабалина А. В. 423, 492
Шабурова Е. В. 722
Шагимарданова Е. И. 499
Шадрин А. М. 501
Шайдулина Р. С. 325
Шалдаева Т. М. 406
Шамаев Н. Д. 242, 569
Шарабрин С. В. 509, 667
Шарипов Р. Р. 532
Шарко О. Л. 270
Шарлаева Е. А. 260
Шарло К. А. 517, 571
Шаршов К. А. 371
Шаскольский Б. Л. 490
Шастина Н. С. 137, 153, 213, 258
Шацкая Н. В. 575
Шашин Д. М. 347
Шашкина С. С. 113, 219
Шварц А. П. 643
Шевелёва М. П. 109
Шевченко В. П. 348
Шевченко О. В. 244
Шевченко Ю. А. 21, 62, 68, 443, 599, 726
Шеина О. Д. 246
Шелковникова В. Н. 38, 219, 248
Шемякин Е. В. 371
Шенкман Б. С. 571
Шестакова Е. А. 558
Шешукова Е. В. 358, 573
Шибаева А. С. 250
Шику Х. 599, 726
Шилин С. А. 208
Шипелова А. В. 258
Шиповалов А. В. 396
Шипулин Г. А. 398
Широбокова С. А. 423
Широкая А. А. 274
Шишкин И. Ю. 252
Шишкина В. С. 730
Шишкина О. Д. 575
Шишова А. А. 373
Шлеева М. О. 295, 347
Шляпников М. Г. 708
Шманай В. В. 270
Шмелькова Д. М. 739
Шмидт Е. А. 305, 319
Шолохов В. 64
Шпичка А. И. 712
Шрайнер Е. В. 190
Штылев Г. Ф. 254
Шульгина И. С. 396
Шуматов В. Б. 244
Шуралев Э. А. 242
Шустова Е. Ю. 425
Шустова М. Н. 256
Шутко Е. В. 741
Шхалахова Р. М. 577
Шыныбекова Г. О. 441
Щаюк А. Н. 561
Щебляков Д. В. 198
Щеголев О. Б. 196
Щелконогов В. А. 137, 153, 258
Щербаков Д. Н. 166, 260, 379, 513, 671
Щербин Д. Г. 270
Щербина С. А. 499
Юлдашев А. А. 128
Юрина И. А. 105
Юсуповская Е. А. 664
Юхин Ю. М. 246
Юшин И. И. 346
Яголович А. В. 665
Язгарова Р. Р. 101, 743
Яковлев В. А. 667, 722, 745
Яковчук Е. В. 390, 425
Якупова Р. Д. 416
Якушева Е. А. 260
Ямансаров Э. Ю. 261
Яровая О. И. 379
Ярославцев Д. В. 674, 704
Яшина Е. Г. 350
Ященок А. М. 182

СОДЕРЖАНИЕ

РАЗДЕЛ I. **БИОИНФОРМАТИКА**

Borodko D. D., Pleshko E. M., Kirichenko T., Sukhorukov V. N., Omelchenko A. V. IDENTIFICATION OF POTENTIAL MASTER REGULATOR MOLECULES RESPONSIBLE FOR NON-TOLERANT REACTION IN CHRONIC INFLAMMATORY DISEASE 3
Dubovskova S. D., Zamyatin A. A. VALIDATION OF *A. COLUZZII* AND *A. GAMBIAE* HYBRIDS HAPLOTYPE PHASING BY TRIO BINNING 5
Guryev D. I., Verbilo K. M., Zuraev A. V. PREDICTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF 1,4-DISUBSTITUTED 1*H*-1,2,3-TRIAZOLE DERIVATIVES BY MOLECULAR DOCKING 8
Gusarov Y., Mikhailova A., Efimenko B., Gunbin K., Bushuev A., Burskaya V., Popadin K. WATER AND AIR — SHAPERS OF BIRDS MTDNA EVOLUTION 10
Ivontsin L. A., Mashkovtseva E. V., Nartsissov Y. R. INSIGHTS ON THE PROTON TRANSLOCATION PATHWAYS IN BACTERIAL F_OF_1-ATP SYNTHASE 12
Jdeed G., Morozova V. V., Tikunova N. V. ANALYSIS OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* ANTIPHAGE DEFENSE SYSTEMS 13
Lobanova V. V., Mikhaylova A. G., Popadin K. Y. UV LIGHT EXPOSURE IN AMPHIBIAN GENOMES: CC:GG>TT:AA 15
Milovidov G. D., Tikhomirova T. S., Nemashkalov V. A. COMPARATIVE ANALYSIS OF AMINO ACID SEQUENCES OF S8 PEPTIDASE FROM *BACILLUS* SPP. 16
Ree N. A., Potapova N. A., Van N. S. Leiden, **Gunbin K. V., Popadin K. Y.** EFFECT OF MUTAGENS ON THE STABILITY OF MITOCHONDRIAL GENOME 18
Акуневич А. А., Хрусталёв В. В. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КАК ЭТАП ДИЗАЙНА ЧАСТИЧНОГО АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА 19
Алрхмун С., Перик-Заводский Р. Ю., Перик-Заводская О. Ю., Лопатникова Ю. А., Жукова Ю. В., Шевченко Ю. А., Волынец М. О., Сулейманов Ш. К., Сивицкая Н. А., Киреев Ф. Д., Альшевская А. А., Сенников С. В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОРОГОВ АКТИВАЦИИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ К ФНО-А НА ОСНОВЕ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ К НЕМУ 21
Бадамшин Э. А., Скуднов А. В., Попадьин К. Ю., Гунбин К. В., Денисов С. В. СДВИГ В РАСПРЕДЕЛЕНИИ НУКЛЕОТИДОВ МЕЖДУ ЛИДИРУЮЩЕЙ И ОТСТАЮЩЕЙ ЦЕПЯМИ БАКТЕРИЙ ВЫЗВАН АССИМЕТРИЧНЫМ МУТАГЕНЕЗОМ 23
Байрамова С. П. МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ ПРОФИЛЯМИ АГРЕССИИ И ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ВАРИАЦИЯМИ BDNF, HTR2A И DRD4 26
Васильев А. В., Ермолаев А. С., Ульянов Д. С., Воронежская В. С., Съедина Н. М., Тощаков С. В., Лапочкина И. Ф., Дивашук М. Г. НА ШАГ БЛИЖЕ К ПАНГЕНОМУ: ПОИСК КРУПНОМАСШТАБНЫХ ИНТРОГРЕССИЙ В ГЕНОМАХ РОССИЙСКИХ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ДОНОРОВ 27
Воронежская В. С., Ермолаев А. С., Ульянов Д. С., Дмитриева А. Р., Съедина Н. М., Васильев А. В., Сотченко Д. Ю., Тощаков С. В. КЛАССИФИКАЦИЯ ОСНОВНЫХ ГЕТЕРОЗИСНЫХ ГРУПП КУКУРУЗЫ НА ОСНОВЕ GENOTYPING-BY-SEQUENCING С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ WGS-ЯКОРЕЙ ИЗ ОТКРЫТОГО ДОСТУПА 30
Глебов С. Н., Лямина Ю. В., Мазинг М. С., Поляков А. С., Носков Я. А., Зайцева А. Ю. РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ КЛАССИФИКАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ОПТИЧЕСКИХ ДАТЧИКОВ 32

Гоглев А. В., Пастухова Н. Д. ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДЛЯ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ГЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR-CAS У АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ 34
Дерюженко М. А., Грунтенко Н. Е. ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ *DROSOPHILA MELANOGASTER*, ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ С НИЗКИМ УРОВНЕМ ДОСТОВЕРНОСТИ, НО ВНОСЯЩИХ ЗНАЧИМЫЙ ВКЛАД В ОТВЕТ НА ТЕПЛОВОЙ ШОК 36
Дмитриева М. Е., Шелковникова В. Н., Потапова Н. А., Аксенов-Грибанов Д. В. ОЦЕНКА СИНТЕЗА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И СОСТАВА КЛАСТЕРОВ ГЕНОВ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА ТЕРМОФИЛЬНОГО ШТАММА *STREPTOMYCES* 38
Добыш О. И., Царь А. И. АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA* НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ 40
Дунаев Я. Д., Стародумов И. О., Микушин П. В., Махаева К. Е., Низовцева И. Г. МОДИФИКАЦИЯ МОДЕЛИ ПОПУЛЯЦИИ МИКРОБНОЙ КУЛЬТУРЫ С УЧЕТОМ ПРОДУКТОВ МЕТАБОЛИЗМА И ФАКТОРА АДАПТАЦИИ 43
Замятин В. И., Охрименко Г. С., Боровикова И. И., Зобова Е. В., Никулин Д. А., Данковцева Е. Н., Затейщиков Д. А., Попцова М. С. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ЛЕГОЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ И АНАЛИЗА SNP У 74 ПАЦИЕНТОВ 45
Зыкова М. А., Поттер И. А., Макашов А. А. ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПСЕВДОГЕНА ENSG00000186076 47
Корзун И. А., Егоров К. С. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНВАЗИВНЫХ И НЕИНВАЗИВНЫХ ДАННЫХ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ 48
Котов И. А., Аглетдинов М. Р., Роев Г. В., Пимкина Е. В., Надтока М. И., Пересадина А. В., Бухарина А. Ю., Светличный Д. В., Гончаров С. Е., Выходцева А. В., Борисова Н. И., Чанышев М. Д., Агабалаев Д. Н., Саенко В. В., Хафизов К. Ф., Акимкин В. Г. ГЕНОМНЫЙ НАДЗОР ЗА SARS-COV-2 И РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ХОДА ПАНДЕМИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С ПОМОЩЬЮ ПЛАТФОРМЫ VGARUS 50
Кутырева Л. И., Попинако А. В., Диброва Д. В., Коношенкова А. В., Кутырев И. А. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ И СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ ИЗ *DIBOTHRIOCEPHALUS DENDRITICUS, DIBOTHRIOCEPHALUS LATUS, LIGULA INTERRUPTA* КАК ЭТАП ПОИСКА АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗ-ИММУНОРЕГУЛЯТОРОВ 53
Лапенко А. К., Ольховая Е. Р., Купцова П. С., Ляпунова Е. Р., Комарова Л. Н. СПОСОБ ОЦЕНКИ ЧИСЛА ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК В КЛЕТОЧНОМ СФЕРОИДЕ ПОСРЕДСТВОМ МТТ-АНАЛИЗА 56
Левченко И. Н., Панкратов В. С., Владимиров Г. К., Левченко А. А., Володяев И. В. ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОРФИРИНОВОГО КОЛЬЦА В СОСТАВЕ ЦИТОХРОМА *C* С КАРДИОЛИПИНОМ АКТИВИРОВАННОЙ КУМАРИНОМ C_{525} ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КОМПЛЕКСА 58
Мокин Я. И., Поварова О. И., Антифеева И. А., Туроверов К. К., Кузнецова И. М., Фонин А. В. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЯДЕРНЫХ И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ 60
Назаров К. В., Шевченко Ю. А., Перик-Заводский Р. Ю., Перик-Заводская О. Ю., Алрхмун С., Волынец М. О., Сенников С. В. ОСТРАЯ КРОВОПОТЕРЯ ВЫЗЫВАЕТ ПОВЫШЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ РАМР-ГЕНА *CLEC5A* В ЭРИТРОИДНЫХ ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ 62
Никишина М. А., Федотов С. П., Маковеева Е. В., Шолохов В. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССА ПОГЛОЩЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ КЛЕТКАМИ 64
Орехов Н. А., Бородко Д. Д., Плешко Е. М., Омельченко А. В. ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ МОДЕЛЕЙ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ НА ОСНОВАНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АТЕРОСКЛЕРОЗА 66
Перик-Заводский Р. Ю., Перик-Заводская О. Ю., Шевченко Ю. А., Волынец М. О., Алрхмун С., Денисова В. В., Сенников С. В. МУЛЬТИОМИКА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК РАСКРЫВАЕТ ЗАВИСЯЩИЕ ОТ СТАДИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПАТТЕРНЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУННОГО ОТВЕТА В ЭРИТРОИДНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ 68
Плешко Е. М., Бородко Д. Д., Орехов Н. А., Омельченко А. В. ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ С НОРМАЛЬНОЙ И ДЕФЕКТНОЙ МИТОФАГИЕЙ 71

Ребик А. А. ПРОГРАММА RATAT ДЛЯ ОБРАБОТКИ И АНАЛИЗА ЭЛЕКТРОКОРТИКОГРАММЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ 73
Резайкин А. В., Микушин П. В., Низовцева И. Г., Чигирева А. А., Дубова В. И., Глебова А. Е. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ АЛГОРИТМОВ ПОИСКА ПРОФАГОВ В БАКТЕРИАЛЬНОМ ГЕНОМЕ 75
Скуднов А. В., Бадамшин Э. А., Лобанова В. В., Ефименко Б. Э., Гунбин К. В., Попадьин К. Ю., Денисов С. В. ТЕРНИСТЫЙ ПУТЬ К РЕКОНСТРУКЦИИ И АНАЛИЗУ МУТАЦИОННЫХ СПЕКТРОВ АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ ПРОКАРИОТ 78
Съедина Н. М., Ермолаев А. С., Ульянов Д. С., Воронежская В. С., Васильев А. В., Тощаков С. В., Дивашук М. Г. ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕГМЕНТОВ ИНТРОГРЕССИВНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ В ГЕНОМЕ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ GBS 80
Филиппова А. С., Нечаева И. А. БИОИНФОРМАТИЧЕСКИЙ ПОИСК ГЕНОВ СИНТЕЗА БИОСУРФАКТАНТОВ В ШТАММЕ *GORDONIA AMICALIS* G2 82
Цейликман Д.-М. В., Бурлаков Е. В. РАНЖИРОВАНИЕ И ОТБОР КАССЕТНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ГЕННОЙ СЕТИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО СТРЕССОРНОГО РАССТРОЙСТВА 85

Раздел II. **Биотехнологии**

Alaji M., Shalaev A., Kolpashchikov D. M., Eldeeb A. A. ULTRASENSITIVE-SELECTIVE DNA MACHINE FOR TESTICULAR GERM CELL TUMORS DETECTION 87
Barbaros M-M. A., Cartasev A. A., Neicovcena I. S., Mahamat N. Y. BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW MILK FROM THE SOUTH OF THE REPUBLIC OF MOLDOVA 89
Li E. G., Karpunina O. A., Morozov A. N., Evdokimova O. L. A CASE STUDY OF PREVENTING IgG4 DRUG PRODUCT AGGREGATION 91
Mikheeva E. I., Kuranova M. A., Gorokhova A. A. DOWNSTREAM PROCESS FOR MODIFIED BACTERIAL CELLULOSE PRODUCTION WITH AN INCREASED FUNCTIONAL PROPERTIES FOR TEXTILE INDUSTRY 92
Romanovskaya K. S. BIOTESTING OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS FROM QUAIL LITTER 93
Sachanka A. B., Dolgaya S. S., Shchur V. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. INFLUENCE OF THE DNA BINDING PROTEIN SSO7D FROM *S. SOLFATARICUS* ON THE ACTIVITY OF BOVINE DNA-EXOTRANSFERASE AND ITS TRUNCATED VARIANTS 94
Smirnova O. S., Konstantinova I. D. BIOTECHNOLOGICAL SYNTHESIS THE ANTIVIRAL DRUG RIBAVIRIN ANALOGUES MODIFIED ON THE AMIDE GROUP 96
Астрелина П. С., Казакова А. В. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ПРОТЕАЗЫ ULP1 И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ГИДРОЛИЗА SUMO-ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ 97
Афанасьева А. А., Кельциева О. А., Подольская Е. П. ФОТОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ НА ПОВЕРХНОСТИ МАЛДИ-МИШЕНИ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ОЦЕНКИ ОБРАЗОВАНИЯ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ПРОДУКТОВ ОКИСЛЕНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ 99
Биккузин Т. И., Язгарова Р. Р., Рахматуллин Ш. Р., Галаутдинов М. Ф., Гизатулин Р. Ф., Кильмухаметов Ф. Ф. РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОЙ СИСТЕМЫ «РОГОВИЦА-НА-ЧИПЕ» 101
Бородина Е. Е., Серазетдинова Ю. Р., Фасхутдинова Е. Р., Богачёва Н. Н., Фотина Н. В., Асякина Л. К. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭНДОФИТНЫХ БАКТЕРИЙ НА РОСТОВЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ 103
Бошляков Г. С., Гришина Е. В., Пайбердин А. О., Пак Д. В., Петрова А. М., Родионов Е. М., Юрина И. А., Золотарева М. С. РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ НА ОСНОВЕ ШТАММОВ АЗОТОФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ 105
Булатова М. В., Усова С. В., Башкина Е. С., Куцерубова Н. С., Богрянцева М. П. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭНДОТОКСИНОВ В ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ 107
Величко А. А., Миловидов Г. Д., Шевелёва М. П., Немашкалов В. А. ПОИСК И АНАЛИЗ МУТАНТНЫХ ФОРМ СУБТИЛИЗИНА Е ИЗ *BACILLUS SUBTILIS*: ОПТИМИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ЗАРЯД-ЗАРЯДОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ТОЧКУ БЕЛКА 109

Веснина А. Д., Просеков А. Ю. ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *HEDYSARUM NEGLECTUM* LEDEB 111
Власова А. А., Липатова О. Е., Тельнова Т. Ю., Моргунова М. М., Шашкина С. С., Аксёнов-Грибанов Д. В. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ ЯИЦ МУРАВЬЕВ 113
Воронина Д. Г., Патраханов Е. А., Покровский В. М., Сушкова Д. Н., Дейкин А. В., Корокин М. В. ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИКА С НОКАУТОМ ГЕНА CSN2 (B-CAS) 115
Генералов Е. А., Ларюшкин Д. П., Крицкая К. А., Генералова Л. В. ПРОТИВОГИПОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛИСАХАРИДА ИЗ *SOLANUM TUBEROSUM* L. 117
Гербст А. Г., Моисеева А. А., Семейкина А. А. РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРЕПТОМИЦИНА В МОЛОКЕ 119
Герцен М. М., Переломов Л. В. ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ОРГАНОГЛИН И ИХ КОМПЛЕКСОВ С PB(II) НА АВТОХТОННЫЕ ПОЧВЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ 121
Голубев Д. М., Коробейникова А. С., Нечаев В. Н., Нечаева О. В., Глинская Е. В. СКРИНИНГ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПО СПЕКТРУ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ 124
Горбунова Е. А., Епанчинцева А. В. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБОВ УВЕЛИЧЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ СИГНАЛА ОСНОВНЫХ ТИПОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК В ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ 126
Дворецкая В. А., Семенов В. Г., Юлдашев А. А. РАЗРАБОТКА БИОГЕННОЙ КОРМОВОЙ ДОБАВКИ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ И РЕАЛИЗАЦИИ ПРОДУКТИВНЫХ КАЧЕСТВ РУССКОГО ОСЕТРА 128
Демиденко Д. В., Варламова Н. В., Халилуев М. Р. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТИПА ЭКСПЛАНТА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ ИНДУКЦИИ НЕПРЯМОГО ОРГАНОГЕНЕЗА ПОБЕГОВ У КЛЕЩЕВИНЫ СОРТА ЗАНЗИБАР ГРИН В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* 131
Десюкевич П. Ю., Солодков П. П., Беловежец Т. Н., Чикаев А. Н. РЕКОМБИНАНТНЫЕ МУЛЬТИВАЛЕНТНЫЕ АНТИТЕЛА НА ОСНОВЕ VHH, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ВАРИАНТОВ SARS-COV-2 133
Дудник Д. Е., Иркитова А. Н., Малкова А. В., Кожевникова Е. Н. СКРИНИНГ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ РОДА *BACILLUS,* ОБЛАДАЮЩИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ *E. COLI* 135
Евстратова А. Ю., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Товпеко Д. В., Соколова М. О., Иванова А. К., Соловьева Э. Ю., Федин А. И., Щелконогов В. А. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С ГРАНУЛОЦИТАРНЫМ КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИМ ФАКТОРОМ 137
Егорова А. И., Сергеев В. Г. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЭКСТРАКТАХ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК 139
Игнатов А. Н., Матвиенко Е. В. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММОВ *R. ANDROPOGONIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ ЗЛАКОВ 141
Ильичева П. М., Пиденко П. С., Бурмистрова Н. А. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ АЛЬБУМИНА, ИМПРИНТИРОВАННОГО ПИЩЕВЫМ ТОКСИНОМ 144
Иминова Л. Р. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ-ДЕСТРУКТОРОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ОТ ТОКСИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ 145
Ионов Я. А., Хасанов Д. Г., Фрейнкман О. В., Назарова Е. А. МОНИТОРИНГ ПРОЦЕССА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ПОРЧИ МЯСНЫХ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ИНДИКАТОРОВ 147
Каночкина М. С., Галимова А. Р., Виноградов М. В. ВЫДЕЛЕНИЕ И ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOCOCCUS LACTIS* SPP. 149
Карандашов И. В., Брезгин С. А., Фролова А. С., Тихонов А. С., Пономарева Н. И., Костюшева А. П., Чуланов В. П., Костюшев Д. С. КАМУФЛИРОВАНИЕ АП-КОНВЕРСИОННЫХ НАНОЧАСТИЦ: ВЛИЯНИЕ НА ИНТЕРНАЛИЗАЦИЮ, БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ И ТОКСИЧНОСТЬ *IN VITRO* И *IN VIVO* 151

Козлова О. А., Щелконогов В. А., Иншакова А. М., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Соловьева Э. Ю., Федин А. И. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ С КОФЕЙНОЙ КИСЛОТОЙ И ГЛУТАТИОНОМ 153
Кокоулин М. С., Кузьмич А. С., Фильштейн А. П., Романенко Л. А. УНИКАЛЬНЫЕ УГЛЕВОДСОДЕРЖАЩИЕ БИОПОЛИМЕРЫ МОРСКИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ....155
Колмогоров И. М., Тимошенко В. А., Григорян И. В., Ле-Дейген И. М. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ЛЕВОФЛОКСАЦИНА С ЛЕГОЧНЫМ СУРФАКТАНТОМ....157
Коновалова Е. А., Калинина Е. Н., Росина Е. В., Зиганшина С. Е., Кормщикова Е. С. ВЛИЯНИЕ СТАБИЛИЗАТОРОВ НА СОХРАННОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ПРОТИВ ГЕПАТИТА В 160
Кравченко С. В. ПОЛУЧЕНИЕ БИОСИЛИКОНА НА ОСНОВЕ ЖЕЛАТИНА 162
Кузьмицкая А. А., Калёнов С. В. ПОСТРОЕНИЕ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО ДЕРЕВА БАКТЕРИИ *BREVIBACILLUS FORMOSUS* DSM 9885 И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ 164
Кукина Т. П., Елшин И. А., Колосова Е. А., Колосов П. В., Щербаков Д. Н., Чуркин М. И. ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИТОСТЕРИНОВ ЭКСТРАКТОВ ВАСИЛЬКА ШЕРОХОВАТОГО (*CENTAUREA SCABIOSA* L.) 166
Лаврова Т. В., Харькова А. С. РЕДОКС-АКТИВНЫЙ ПОЛИМЕР «БЫЧИЙ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН — САФРАНИН», ПРИМЕНЯЕМЫЙ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛА И МОЧЕВИНЫ 168
Ланцова Е. А. ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ КАК ПОРООБРАЗУЮЩЕГО АГЕНТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ СИЛАНОВЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И ОКТЕНИДИНА ДИГИДРОХЛОРИДА 170
Лапенко А. К., Ольховая Е. Р., Чудновец Т. А., Купцова П. С., Комарова Л. Н. ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КЛЕТОК ПОЧКИ ЭМБРИОНА ЧЕЛОВЕКА HEK-293 172
Левчук О. Д., Сапунова Л. И. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЛИПАЗЫ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA* SPECIES ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В СЫРОДЕЛИИ 173
Лунев Е. А., Воловиков Е. А., Попов С. В., Егорова Т. В., Бардина М. В. ИНВЕРТИРОВАННЫЕ КОНЦЕВЫЕ ПОВТОРЫ АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА ДЕМОНСТРИРУЮТ ПРОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ В ГАМКЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ *IN VITRO* 175
Лысакова В. С. АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОГРУЖЕННОЙ КУЛЬТУРЫ *HERICIUM CORALLOIDES* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСТОЧНИКОВ ПИТАНИЯ 177
Маркова А. Ю., Кондратьева Л. Г. СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ HSPA14 179
Миронова Е. М., Пономаренко Е. А., Белов А. К., Грюк А. О., Марыгин Р. А., Воронина Е. В., Серегин Ю. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК НА СИАЛИРОВАНИЕ ДАРБЭПОЭТИНА-АЛЬФА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРОДУЦЕНТА НА ОСНОВЕ *CHO* В РЕЖИМЕ FED-BATCH 181
Моисеева Е. О., Чернышёв В. С., Ященок А. М. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЗАХВАТА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МАГНИТНЫМИ МИКРОСФЕРАМИ, ПОКРЫТЫМИ ДУБИЛЬНОЙ КИСЛОТОЙ 182
Морозова Е. П., Красицкая В. В., Франк Л. А. РАЗРАБОТКА ЛАТЕРАЛЬНОГО ПРОТОЧНОГО АПТАСЕНСОРА ДЛЯ ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА КАРДИОМАРКЕРА ТРОПОНИНА I 184
Никанова Л. А., Максимов В. И., Березова К. А. ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС ПОРОСЯТ 186
Петрова А. А., Салищева О. В. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ 188
Покушалов Е. А., Пономаренко А. В., Байрамова С. А., Гарсия К., Пак И. А., Шрайнер Е. В., Воронина Е. Н., Соколова Е. А., Джонсон М., Миллер Р. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК ОМЕГА-3 ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА ЛИПИДНЫЙ ПРОФИЛЬ У ВЗРОСЛЫХ С ПОЛИМОРФИЗМОМ PPARG: РАНДОМИЗИРОВАННОЕ ДВОЙНОЕ СЛЕПОЕ ПЛАЦЕБО-КОНТРОЛИРУЕМОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 190
Привалова А. А., Выборная Т. В., Бубнов Д. М., Степанова А. А., Хозов А. А., Молев С. В., Синеокий С. П. ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ О-АЦЕТИЛГОМОСЕРИНСУЛЬФГИДРИЛАЗЫ В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI* 192

Риппинен Д. В., Соловьева А. О. ХАРАКТЕРИСТИКА ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИОЦИТОВ КАК ОСНОВА *IN VITRO* МОДЕЛИ ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ТЕРАПИИ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА 194
Русина Д. С., Вареха Н. В., Гимадиев Р. Р., Щеголев О. Б., Варакина-Митрай К. А., Димитров В. О. ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДОВ ИСКУССТВЕННОГО ИНТЕЛЛЕКТА В СНИЖЕНИИ СМЕРТНОСТИ ТРУДОСПОСОБНОГО НАСЕЛЕНИЯ РФ ОТ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ....196
Рябова Е. И., Деркаев А. А., Довгий М. А., Воронина Д. В., Блинов А. А., Вансович А. С., Хоссаин Р. М., Фаворская И. А., Щебляков Д. В., Есмагамбетов И. Б. ДОСТАВКА ГЕНОВ ТЕТРАМЕРИЗОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ПОМОЩИ РЕКОМБИНАНТНОГО АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ИНДУКЦИИ ЗАЩИТЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА А И ВИРУСА SARS-COV-2 198
Сазонова О. С., Архипов И. А. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ МОДИФИКАЦИИ ХИТОЗАНА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОМЕДИЦИНЕ 200
Сакаян Д. И., Калёнов С. В., Хохлачев Н. С., Романовская К. С. ИЗУЧЕНИЕ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕТАНОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ ГРАНУЛИРОВАННЫМ АЭРОБНЫМ ИЛОМ В РЕАКТОРЕ ОТЪЕМНО-ДОЛИВНОГО ТИПА 202
Сараев Г. И., Марченко Р. Д., Кускова И. С. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДОБАВОК ЛИЧИНОК *HERMETIA ILLUCENS* И ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА К ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ БИОМАССЫ ГРИБОВ РОДА *CORDYCEPS* 205
Селиванов П. А., Федотов П. А., Ульянкин Д. А., Шилин С. А. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА: ВОЗМОЖНОСТИ НА ГОСПИТАЛЬНОМ ЭТАПЕ 208
Стародумов И. О., Микушин П. В., Махаева К. Е., Никишина М. А., Низовцева И. Г. ГИДРОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ МАССОПЕРЕНОСА В ПУЗЫРЬКОВЫХ СРЕДАХ 210
Стучинская М. Д., Николаева Л. И., Шастина Н. С. ЗНАЧИМОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К В-КЛЕТОЧНЫМ ДЕТЕРМИНАНТАМ ОБОЛОЧЕЧНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С 213
Судьина А. К., Гольдштейн Д. В., Силачев Д. Н., Салихова Д. И. ТРАНСПЛАНТАЦИЯ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ УСИЛИВАЕТ ВОССТАНОВЛЕНИЕ СЕНСОМОТОРНОГО ДЕФИЦИТА КРЫС ПОСЛЕ ТРАВМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА 215
Тарасова Д. А., Черенков И. А. КОМПОЗИТНЫЕ ГИДРОГЕЛЕВЫЕ МАТРИЦЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ 217
Тельнова Т. Ю., Моргунова М. М., Власова А. А., Шашкина С. С., Мишарина Е. А., Шелковникова В. Н., Липатова О. Е., Белышенко А. Ю., Листопад А. С., Аксёнов-Грибанов Д. В. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ИБУПРОФЕНА В ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОДАХ ОЗЕРА БАЙКАЛ 219
Тихонов А. С., Брезгин С. А., Фролова А. С., Пономарева Н. И., Костюшева А. П., Паришина Е. Ю., Слатинская О. В., Максимов Г. В., Замятнин А. А., Чуланов В. П., Костюшев Д. С. АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕОЛИПИДОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦАХ 221
Торопова А. В., Копылова А. А., Павлова А. Ю., Баракова Н. В. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА В СОСТАВЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ....223
Федина В. В., Ковалева А. А., Алферов С. В. ПАРАМЕТРЫ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДИФИЦИРОВАННОГО АНОДА НА ОСНОВЕ ОКСИДА ГРАФЕНА....225
Филиппова Е. С., Звонарев А. Н., Лаврова Д. Г. ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* MG1655 В ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯТОВ КРЕМНИЯ: ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗ, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ОЦЕНКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ 227
Фомина А. А. РЕКОМБИНАНТНЫЙ СТРЕПТАВИДИН ДЛЯ ХИМИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ....229
Цатурян Г. А., Маляровская В. И. ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO HELLEBORUS CAUCASICUS* A. BR. 231
Цыганов В. А., Глаголева Е. В., Джавахия В. В., Воинова Т. М. ПОЛУЧЕНИЕ НОВОГО ШТАММА *ASPERGILLUS TERREUS*, ОБЛАДАЮЩЕГО АНТИФУНГАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ *FUSARIUM OXYSPORUM* 233

Чепурко В. Г., Синеокий С. П., Гордеева Т. Л. НОВАЯ ГИБРИДНАЯ В-АМИЛАЗА: ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ 236
Чернов К. П., Бурлаковский М. С., Окулова Е. С., Аглиуллина Д. Р., Падкина М. В., Лутова Л. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЮЦЕРНЫ СЛАБОУСЕЧЕННОЙ (*MEDICAGO TRUNCATULA* GAERTN.), ПРОДУЦИРУЮЩИХ КУРИНЫЙ ИНТЕРФЕРОН-ГАММА 238
Чечкова Н. А. МИЕЛОПЕРОКСИДАЗА КАК ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ МАРКЕР ВОСПАЛЕНИЯ НА ПРИМЕРЕ *PARASALMO MYKISS* 240
Шамаев Н. Д., Шуралев Э. А., Мукминов М. Н. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ *APIS MELLIFERA* В ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ *IN VITRO* 242
Шевченко О. В., Черненко И. Н., Елисеева Е. В., Медков М. А., Шуматов В. Б. РАЗРАБОТКА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ ХЛОРИНА e6 С РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ 244
Шеина О. Д., Даминов А. С., Юхин Ю. М. ПОЛУЧЕНИЕ СОЕДИНЕНИЙ ВИСМУТА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ ИЗ СВИНЦА ВИСМУТИСТОГО 246
Шелковникова В. Н., Дмитриева М. Е., Баталова А. А., Белышенко А. Ю., Листопад А. С., Аксенов-Грибанов Д. В. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ БАЙКАЛЬСКОГО ОКСИФИЛЬНОГО ШТАММА *JANTHINOBACTERIUM* SP. НА МУЖСКИЕ ПОЛОВЫЕ КЛЕТКИ 248
Шибаева А. С., Глаголева Е. В., Воинова Т. М., Джавахия В. В. 250
ИССЛЕДОВАНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ЭРЕМОМИЦИНА В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЗНАЧЕНИЯХ ТЕМПЕРАТУРЫ И PH 250
Шишкин И. Ю., Синников К. А., Чиркова П. А., Лапа С. А., Чудинов А. В. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ АНАЛИЗА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НА «ЩЕТОЧНЫХ» БИОЧИПАХ МЕТОДОМ ТВЕРДОФАЗНОЙ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР 252
Штылев Г. Ф., Качуляк Д. А., Заседателева О. А., Чудинов А. В. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМИНОСОДЕРЖАЩИХ КАТАЛИЗАТОРОВ РАСКРЫТИЯ ОКСИРАНОВОГО ЦИКЛА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ «ПОЛИМЕРНЫХ ЩЕТОК» ИЗ ГЛИЦИДИЛМЕТАКРИЛАТА В ТЕХНОЛОГИИ БЕЛКОВЫХ БИОЧИПОВ 254
Шустова М. Н., Капаруллина Е. Н., Доронина Н. В. ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ГАЛОФИЛЬНОГО ШТАММА *VREELANDELLA TITANICAE* 3SOL ИЗ ГИПЕРГАЛИННОГО ОЗЕРА ДУНИНО (Г. СОЛЬ-ИЛЕЦК, ОРЕНБУРГСКАЯ ОБЛАСТЬ) 256
Щелконогов В. А., Козлова О. А., Иншакова А. М., Дарнотук Е. С., Шипелова А. В., Шастина Н. С., Баранова О. А., Чеканов А. В., Казаринов К. Д., Соловьева Э. Ю., Федин А. И. АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИАГРЕГАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАНОДИСПЕРСИЙ С ЛИПОЕВОЙ КИСЛОТОЙ 258
Якушева Е. А., Шарлаева Е. А., Колосов П. В., Щербаков Д. Н. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ КЕРАТИНАЗЫ В ПРОДУЦЕНТЕ *BACILLUS MOJAVENSIS* 260
Ямансаров Э. Ю., Казакова О. Б. ГАЛОНИТРО-ТРИТЕРПЕНОИДЫ — ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АГЕНТЫ КОВАЛЕНТНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ПЕПТИДАМИ И БЕЛКАМИ 261

Раздел III. **Биофизика**

Alkhateeb R., Semidetnov I. S., Romanova S. A., Slotvitsky M. M., Tsvelaya V. A., Agladze K. I. OPTICAL CONTROL OF INTERCELLULAR CALCIUM DYNAMICS IN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL-DERIVED CARDIOMYOCYTES WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY 263
Bozdaganyan M. E., Orekhov P. S. RECENT ADVANCEMENTS IN COARSE-GRAINED SIMULATIONS OF BIOMOLECULAR SYSTEMS 264
Kunina E. I., Shernyukov A. V., Yudkina A. V., Zharkov D. O., Bagryanskya E. G. DETERMINATION OF THE SPATIAL STRUCTURE OF A DNA DUPLEX WITH A NON-COMPLEMENTARY CU PAIR BY NMR SPECTROSCOPY 266
Podarov R. A., Kolokolov M. I., Tretyakov E. V., Fedin M. V., Krumkacheva O. A. DIPOLAR EPR SPECTROSCOPY OF FULLERENE AND PORPHYRIN SYMMETRIC PAIRS 268
Абашкин В. М., Жогла В. А., Игнатьев-Качан А. О., Шарко О. Л., Шманай В. В., Щербин Д. Г. СОЗДАНИЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА И ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛЕСТЕРОЛА ДЛЯ ДОСТАВКИ МАЛЫХ ИНТЕРФЕРИРУЮЩИХ РНК 270

Бакуменко С. С., Романова С. А., Аитова А. А., Наумов В. Д., Семидетнов И. С., Бережной А. К., Слотвицкий М. М., Цвелая В. А., Агладзе К. И. ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ЭФАПТИЧЕСКОЙ СВЯЗИ КАРДИОМИОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ОДНОНАПРАВЛЕННОГО БЛОКА ПРОВЕДЕНИЯ....272
Березина О. Я., Ерохова П. И., Широкая А. А., Ляшков П. О. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ СИНТЕЗА ЛЕГИРОВАННОГО ПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННОГО АДАПТОГЕННОГО ПРЕПАРАТА 274
Быков А. С., Молчанов С. Г., Егоров А. Е., Корякин С. Н., Аршинцева Е. В., Пушкин С. Ю., Теплова П. О., Тимченко М. А. ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОМИТИГАТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА MYOTIVE 276
Гатаулина Э. Д., Николаев М. В. ВОЗМОЖНОСТЬ ФОТОКОНТРОЛЯ ПРОТОН-АКТИВИРУЕМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ 278
Гефтер С. Д., Поспелов А. Д., Трушина Д. Б., Ефремов Ю. М., Карпушин М. Ю., Балалаева И. В. ИССЛЕДОВАНИЕ РОСТА КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЯИЧНИКА ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ SKOV-3 В БЕСКЛЕТОЧНЫХ МАТРИКСАХ ОРГАНОВ МЫШИ С РАЗЛИЧНЫМИ СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ....280
Дубенская Н. А., Соколова Е. М., Психа Б. Л., Нешев Н. И. КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМЫ ОКСИДАТИВНОГО ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАДИКАЛЬНЫХ ИНИЦИАТОРОВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ....283
Иванова А. А., Симоненко Е. Ю. КРИСТАЛЛООБРАЗОВАНИЕ В КРИОПРОТЕКТОРНЫХ СРЕДАХ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ЗАМОРОЗКИ....285
Калганова А. И., Пипия С. О., Смирнов И. В., Терехов С. С. СОЗДАНИЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО СКРИНИНГА КОМБИНАТОРНЫХ БИБЛИОТЕК АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ....287
Канарская М. А., Ломзов А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ САМООГРАНИЧЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ РНК К ДЕЙСТВИЮ ИСКУССТВЕННЫХ РИБОНУКЛЕАЗ 289
Киселева Д. Г., Джабраилов В. Д., Аитова А. А., Турчанинова Е. А., Цвелая В. А., Плюснина Т. Ю., Маркин А. М. ВЛИЯНИЕ ОТЕКА КЛЕТОК НА ИЗМЕНЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКИХ РЕЖИМОВ РАСПРОСТРАНЕНИЯ КАЛЬЦИЕВОЙ ВОЛНЫ В МОНОСЛОЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫСИНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ 291
Коваленко С. Г., Фролова Ш. Р. АКТИВНОСТЬ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ БЕТА-АДРЕНОСТИМУЛЯЦИИ....293
Козобкова Н. В., Самцов М. П., Луговский А. П., Тарасов Д. С., Белько Н. В., Савицкий А. П., Капрельянц А. С., Шлеева М. О. ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННАЯ АТАКА НА МИКОБАКТЕРИИ: НОВЫЙ МЕТОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРЕГАЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО ТРИКАРБОЦИАНИНОВОГО КРАСИТЕЛЯ....295
Лапшина К. К., Нефёдова В. В., Роман С. Г., Набиев С. Р., Матюшенко А. М. ВЛИЯНИЕ ИЗОФОРМ ТРМ1.8 И ТРМ1.9 АКТИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ТРОПОМИОЗИНА НА СВОЙСТВА АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА 297
Лобанова А. О., Демкин О. В., Золотарев А. А. ВЛИЯНИЕ ТРОМБИНА И ГЕМАТОКРИТА НА РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ....299
Мифтахова А. Т., Коваленко С. Г., Фролова Ш. Р. ВЛИЯНИЕ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АЗОБЕНЗОЛА НА БЫСТРЫЕ НАТРИЕВЫЕ КАНАЛЫ В НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫСЫ 301
Морозова Ф. В., Голышев В. М., Ломзов А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ N-БЕНЗИМИДАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ 303
Неделяев Е. М., Силонов С. А., Гаврилова А. А., Смирнов Е. Ю., Шмидт Е. А., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Фонин А. В. РОЛЬ СЛАБЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА БЕЛКА PML-V В ОБРАЗОВАНИИ ЖИДКО-КАПЕЛЬНЫХ КОНДЕНСАТОВ....305
Пархаева А. П., Овчинников М. А., Евсеев А. П., Александрова Э. П., Марченко О. М., Симоненко Е. Ю. ВЛИЯНИЕ КОСМИЧЕСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ ЧЕЛОВЕКА....307
Пушкаревская А. А., Аралов А. В., Ломзов А. А. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДНК-ДУПЛЕКСОВ, СОДЕРЖАЩИХ МОДИФИЦИРОВАННЫЙ 8-ОКСО-АДЕНОЗИН, ОБЛАДАЮЩИЙ РОТОРНЫМ ЭФФЕКТОМ 309
Ромодин Л. А., Никитенко О. В., Бычкова Т. М., Московский А. А. МЕДНЫЙ ХЛОРОФИЛЛИН И РИБОКСИН (ИНОЗИН) КАК РАДИОЗАЩИТНЫЕ СРЕДСТВА 311

Савицкий М. А., Столярчук Н. М., Богданович В. А., Кузнецов А. В.
МОЖНО ЛИ ИСПОЛЬЗОВАТЬ ЗВУК В КАЧЕСТВЕ ИНСТРУМЕНТА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ИЛИ УПРАВЛЕНИЯ НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫМ МОРСКИМ БИООБРАСТАНИЕМ? 313
Сальседо М. Р. К., **Степанова Л. В., Жукова Г. В.** ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ ИОНОВ НАТРИЯ И ГЛЮКОЗЫ ВЛИЯЮТ НА РЕЗУЛЬТАТ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА СЛЮНЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ УТОМЛЕНИЯ ОРГАНИЗМА 315
Сараджи Н. Г., Астахов Н. С., Наквасина М. А. ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ МОНООКСИДА АЗОТА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ИНИЦИАЦИИ ПРОЦЕССОВ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ В ПРИСУТСТВИИ БИОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ....317
Силонов С. А., Смирнов Е. Ю., Шмидт Е. А., Фонин А. В., Кузнецова И. М., Туроверов К. К.
ХАРАКТЕРИСТИКИ КОМПЛЕКСА TRIM27-USP7-PML В СОСТАВЕ ЯДЕРНЫХ PML-ТЕЛЕЦ.....319
Синицына А. П., Бережной А. К., Слотвицкий М. М., Демин А. Г., Зубов А. Г., Цвелая В. А., Агладзе К. И. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФИБРОТИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В МОДЕЛИ ПРЕДСЕРДНОЙ ТКАНИ С ТОЧКИ ЗРЕНИЯ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КАРДИОМИОЦИТОВ ПАЦИЕНТА 321
Слатинская О. В., Браже Н. А., Максимов Г. В. ГИПОКСИЯ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ КИСЛОРОД-ТРАНСПОРТНОГО ОБМЕНА 323
Слотвицкий М. М., Бережной А. К., Сергеева Т. О., Романова С. А., Шайдулина Р. С., Цвелая В. А., Агладзе К. И. РЕГИСТРАЦИИ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ МОЛЕКУЛ NADH В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ 325
Смоленцев А. А., Снытникова О. А., Колосова Н. Г., Телегина Д. В., Центалович Ю. П.
ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА МЕТАБОЛОМНЫЙ ПРОФИЛЬ КРЫС OXYS-МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА 327
Субханкулов М. Р., Зубарева О. Е. РЕАКЦИИ НА ВВЕДЕНИЕ КОНВУЛЬСАНТА ПЕНТИЛЕНТЕТРАЗОЛА У КРЫС С РАЗНОЙ ТЯЖЕСТЬЮ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ 329
Торопцева А. В., Горобец М. Г., Хачатрян Д. С., Абдуллина М. И., Колотаев А. В., Градова М. А., Золотцев В. А., Бычкова А. В. РАЗРАБОТКА ГИБРИДНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ НА ПОВЕРХНОСТИ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ, МОДИФИЦИРОВАННЫМ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТОЙ ДЛЯ РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННОЙ ДОСТАВКИ В ОПУХОЛИ И ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА....331
Трифонова Н. Е., Некрасова Е. И., Тронов В. А., Ванин А. Ф. СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА МОЛЕКУЛ NO^+ В СИСТЕМЕ ПОНИЖАЕТ ЦИТО- И ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ NA-НИТРОПРУССИДА ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ ДИТИОНИТОМ NA НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MCF-7 334
Тряхов Д. Е., Тареева Е. А., Ворошнина А. А., Леонов С. В., Политов А. А. МЕХАНОХИМИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЧАСТИЦ КРАХМАЛА И СУБМИКРОННЫХ ВОЛОКОН ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ИННОВАЦИОННЫХ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ 337
Турчанинова Е. А., Аитова А. А., Романова С. А., Коваленко С. Г., Цвелая В. А., Слотвицкий М. М., Агладзе К. И. РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРОТОКОЛОВ ХИМИЧЕСКОЙ ТРАНСДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ФИБРОБЛАСТОВ В КАРДИОМИОЦИТЫ С ПОМОЩЬЮ БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ПРОГНОЗИРОВАНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ.....340
Хлынова Т. А., Санникова Н. Э., Колоколов М. И., Крумкачева О. А.
ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА G-КВАДРУПЛЕКСА HTEL-22 С КАТИОННЫМ ПОРФИРИНОМ МЕТОДАМИ ЭПР И ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ.....342
Цвелая В. А., Бережной А. К., Синицына А. П., Семидетнов И. С., Наумов В. Д., Слотвицкий М. М.
МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПЛАТФОРМ С ПОМОЩЬЮ СОВМЕЩЕННЫХ *IN SILICO* МЕТОДОВ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ СЕРДЦА 344
Чеботарев Д. В., Юшин И. И., Ломзов А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ БЕНЗОАЗОЛЬНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ С ДНК.....346
Шашин Д. М., Соловьев И. Д., Башева А. И., Савицкий А. П., Шлеева М. О.
ФОТОПРОДУКТ ЭНДОГЕННЫХ ПОРФИРИНОВ УСИЛИВАЕТ ЭФФЕКТ ФОТОИНАКТИВАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ.....347
Шевченко В. П., Путинцева О. В., Соколова Л. О., Артюхов В. Г.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОАРХИТЕКТОНИКИ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ДОНОРОВ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА «МЕДОМЕКСИ» 348

Яшина Е. Г., Варфоломеева Е. Ю., Пантина Р. А., Байрамуков В. Ю., Ковалев Р. А., Федорова Н. Д., Пшеничный К. А., Горшкова Ю. Е., Григорьев С. В. ПРОСТРАНСТВЕННАЯ МОДЕЛЬ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА В ЯДРЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ КЛЕТКИ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ И РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ....350

РАЗДЕЛ IV. **ВИРУСОЛОГИЯ**

Mansour O., Danilenko D. M., Komissarov A. B. DEVELOPMENT OF PRIMER PANEL FOR AMPLICON SEQUENCING OF HUMAN PARAINFLUENZA VIRUS TYPE 3....353
Rykova V. S., Krasnikov N. Y., Yuzhakov A. G. PORCINE VIRUSES IN THE WILD BOAR POPULATION OF THE CENTRAL FEDERAL DISTRICT OF RUSSIA....356
Алимова А. Р., Ершова Н. М., Камарова К. А., Шешукова Е. В., Комарова Т. В. ВИРУС-ИНДУЦИРУЕМЫЙ ФАКТОР KPILP *NICOTIANA TABACUM* СТИМУЛИРУЕТ МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ МАКРОМОЛЕКУЛ....358
Бердиева С. Б., Демина Д. С., Осипов И. Д., Маслов Д. Е., Васиховская В. А., Забелина Д. С., Рузметова С. И., Камолходжаев Д. А., Ибадуллаева Н. С., Хикматуллаева А. С., Мусабаев Э. И., Кушакова Д. Ш., Аглетдинов Э. Ф., Нетёсов С. В. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ СЕРОТИПОВ АДЕНОВИРУСОВ СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С ОРЗ В ТАШКЕНТЕ, РЕСПУБЛИКА УЗБЕКИСТАН....360
Бродская А. В., Грачева А. В., Ахметова А. Р., Хохлова Д. М., Корчевая Е. Р., Смирнова Д. И., Рогова А., Джазули Р., Файзулоев Е. Б. ОЦЕНКА ВИРУСИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ НАНОКАПСУЛ, СОДЕРЖАЩИХ МИРНК, НА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ....362
Ветрова А. Н., Курашова С. С., Егорова М. С., Дзагурова Т. К. ДЛИТЕЛЬНАЯ ПЕРСИСТЕНЦИЯ ХАНТАВИРУСА ПУУМАЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VERO....364
Глущенко А. Г., Чанышев М. Д., Власенко Н. В., Макашова В. В., Хафизов К. Ф. ПОИСК МУТАЦИЙ ВГВ, ПОТЕНЦИАЛЬНО СВЯЗАННЫХ С ВЫСОКИМ РИСКОМ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ И ГЦК ПРИ ВИРУСНОМ ГЕПАТИТЕ В....366
Гостева Т. А., Солодкий В. В., Золин В. В., Оськина О. П. ТОКСИЧНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ И ИХ ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА SARS-COV-2....368
Дёрко А. А., Дубовицкий Н. А., Логинова А. М., Глущенко А. В., Мурашкина Т. А., Прокудин А. В., Шемякин Е. В., Кабилов М. Р., Шаршов К. А. РЕЗУЛЬТАТЫ ДЕСЯТИЛЕТНЕГО МОНИТОРИНГА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА У ДИКИХ ПТИЦ....371
Ермакова М. Ю., Иванов С. В., Шишова А. А., Синюгина А. А. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ПОЛИОМИЕЛИТА ШТАММОВ СЭБИН ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЫ....373
Есаулкова Я. Л., Зарубаев В. В., Краснов В. П. НОВЫЙ ИНГИБИТОР НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА — 6-ЗАМЕЩЕННОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ПУРИНА....375
Железнова А. С., Карташов М. Ю., Свирин К. А. РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ МУТАНТНЫХ ФОРМ ВИРУСА ГЕПАТИТА В, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ....377
Жупикова О. А., Яровая О. И., Маренина М. К., Мешкова Ю. В., Беленькая С. В., Щербаков Д. Н., Зайковская А. В., Пьянков О. В., Михальский М. Г., Зарубаев В. В., Поткин В. И., Колесник И. А., Иванов А. В., Салахутдинов Н. Ф., Хвостов М. В. СИНТЕЗ ТИОСЕМИКАРБОЗОНОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ SARS-COV-2 И ВИРУСОВ ГРИППА H1N1....379
Иващенко И. А., Федотова О. С., Короткова И. А., Панова А. Е., Василевский В. В., Остапчук А. В. ТРЕХМЕРНЫЕ МОДЕЛИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА....381
Калинин А. Г. ПОСЛЕДНИЕ ДАННЫЕ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ВИРУСОВ ПЧЕЛ В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК....383
Камараули Е. Д., Власова А. В., Перевозчиков Д. В., Киров И. В. АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ И ТРАНСПОЗИЦИИ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ РАСТЕНИЙ С ПОМОЩЬЮ НОВОГО ВИРУС-ОПОСРЕДОВАННОГО ПОДХОДА TE-STORM....385
Карелина К. В., Баяндин Р. Б., Пашковский С. Е., Терновой В. А. ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ФЛАВИПОДОБНЫХ ВИРУСОВ В ОБРАЗЦАХ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* И *IXODES PAVLOVSKYI*, СОБРАННЫХ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ....387

Карпова Е. В., Яковчук Е. В., Козловская Л. И. АНАЛИЗ НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВАКЦИНАЦИЕЙ ОТ ПОЛИОМИЕЛИТА, К ПОЛИОВИРУСАМ ВАКЦИННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ТИПА 2 390
Красильникова А. А., Додина М. С., Козловская Л. И. РАЗРАБОТКА ВОСПРОИЗВОДИМОЙ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРИМОГО БЕЛКА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 392
Ксенафонтов А. Д., Фадеев А. В., Коржанова М., Гешко С. А., Комиссаров А. Б., Киселёва И. В., Лиознов Д. А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ АМПЛИФИКАЦИИ SMART ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ РИНОВИРУСОВ....394
Кудров Г. А., Зайнутдинов С. С., Шульгина И. С., Шиповалов А. В., Зайковская А. В., Боднев С. А., Пьянков О. В., Кочнева Г. В. ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА МУКОЗАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ COVID-19 НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ВАРИАНТА ВИРУСА СЕНДАЙ ШТАММА МОСКВА 396
Минтаев Р. Р., Глазкова Д. В., Орлова О. В., Урусов Ф. А., Шипулин Г. А., Богословская Е. В. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПЛАТФОРМЫ НА ОСНОВЕ ОСПОВАКЦИННОГО ШТАММА АНКАРА ДЛЯ БЫСТРОГО ПОЛУЧЕНИЯ ВЕКТОРНЫХ ВАКЦИН 398
Михайлова Е. Е., Байков И. К., Тикунова Н. В. КОНСТРУИРОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА ПРОТИВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С ХИМЕРНЫМ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩИМ БЕЛКОМ 400
Надтока М. И., Пересадина А. В., Бухарина А. Ю., Аглетдинов М. Р., Роев Г. В., Хафизов К. Ф., Акимкин В. Г. ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР И ТЕХНОЛОГИЙ NGS ДЛЯ МОНИТОРИНГА ШИРОКОГО СПЕКТРА ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ 402
Пасивкина М. А., Анурова М. Н., Лаишевцев А. И., Алешкин А. В. РАЗРАБОТКА ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА ДЛЯ БОРЬБЫ С КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ НА ОСНОВЕ КОМБИНАЦИИ ПРО- И ФАГОБИОТИКОВ....404
Проценко М. А., Филиппова Е. И., Шалдаева Т. М., Макаревич Е. В., Пшеничкина Ю. А., Храмова Е. П., Мазуркова Н. А. ПРОТИВОВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ ЛЕВЗЕИ САФЛОРОВИДНОЙ (*RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*) И ВАСИЛЬКА СИНЕГО (*CENTAUREA CYANUS*)....406
Рак А. Я., Прокопенко П. И., Музурова В. В., Руденко Л. Г., Исакова-Сивак И. Н. ПОРА ОБНОВЛЕНИЯ: ПРЕИМУЩЕСТВА АКТУАЛИЗАЦИИ NP КОМПОНЕНТА В СОСТАВЕ ЦЕЛЬНОВИРИОННЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН 408
Свирин К. А., Половкова О. Г., Федорова Е. С., Камалов М. Н., Железнова А. С., Карташов М. Ю. АНАЛИЗ МУТАЦИЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА С СУБТИПА 1В И 3А У ИНФИЦИРОВАННЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛИЦ ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ....410
Степаненко А. А., Сосновцева А. О., Васюкова А. А., Валихов М. П., Чернышева А. А., Абрамова О. В., Чехонин В. П. УЛУЧШЕННАЯ ОНКОЛИТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ АДЕНОВИРУСА 5 ЧЕЛОВЕКА С КОМБИНАЦИЕЙ МУТАЦИЙ В *E3-19K* И *I-LEADER* 412
Торопов С. Е., Рябчевская Е. М., Евтушенко Е. А., Никитин Н. А., Карпова О. В. РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНОГО АНТИГЕНА ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ СПЕКТРА АКТУАЛЬНЫХ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ШТАММОВ....414
Хабибуллин Н. Р., Якупова Р. Д., Вартанова Е. О., Меркулова М. С., Деревянко А. О., Ивин Ю. Ю. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БАКУЛОВИРУСНОЙ ДНК С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ 416
Храпунова Д. Р., Укубаева Д. Г. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ C_{60} И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ В КАЧЕСТВЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ АГЕНТОВ 418
Худайназарова Н. Ш., Грановский Д. Л., Рябчевская Е. М., Кондакова О. А., Архипенко М. В., Евтушенко Е. А., Никитин Н. А., Карпова О. В. РАЗРАБОТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА УНИВЕРСАЛЬНОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ВАКЦИННОГО КАНДИДАТА ПРОТИВ РОТАВИРУСА А 421
Широбокова С. А., Шабалина А. В., Сухих И. С., Долгова А. С., Дедков В. Г. РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА САБИА....423
Яковчук Е. В., Шустова Е. Ю., Козловская Л. И. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОВИРУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СЛУЧАЯМИ СЕРОЗНЫХ МЕНИНГИТОВ В 2023 Г. В РФ 425

Раздел V. **Молекулярная биология**

Awad M. S., Zenkova M. A., Markov O. V. MODULATION OF THE IMMUNOSUPPRESSIVE FUNCTIONS OF *EX VIVO* GENERATED MURINE MYELOID-DERIVED SUPPRESSOR CELLS WITH CYTOKINES AND TUMOR CONDITIONED MEDIUM 427
Darwish A., Eldeeb A. A. INTELLIGENT MAGNETOELECTRIC DRUG-DELIVERING NANOPARTICLES (IMDDNS) FOR REAL-TIME SENSING AND ADAPTIVE THERAPY IN THE TUMOR MICROENVIRONMENT....428
Hussein Z., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M. DESIGN AND DEVELOPMENT OF A PROTECTIVE DNA NANO-TUBE USING DNA ORIGAMI FOR ENHANCED CANCER GENE THERAPY....430
Merkuryev A. V., Grudinina N. A., Garmai Y. P., Arzamastsev G. F., Zabrodskaya Y. A., Egorov V. V. DEVELOPMENT OF THE PEPTIDE HUMAN INSULIN-DEGRADING ENZYME INHIBITOR JURA AND ANALYSIS OF ITS INHIBITORY ACTIVITY 432
Nbeaa A., Nour M. A. Y., Eldeeb A. A., Kolpashchikov D. M. OPTIMIZING SELECTED APTAMERS FOR BINDING TO BOVINE SERUM ALBUMIN: ENHANCING AFFINITY AND STABILITY....433
Nnanyereugo V. O., Dubovichenko M. V., Kolpashchikov D. M., Eldeeb A. A. BIVALENT ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES FOR INCREASED SELECTIVITY AND EFFICIENCY OF RNA DEGRADATION....435
Odarenko K. V., Markov M. A., Zenkova M. A. CONNECTIVITY MAP-BASED DRUG REPURPOSING OF SP600125 TO TARGET MESENCHYMAL TRANSITION IN GLIOBLASTOMA....437
Ugriumov V. S., Prusakov R. Z., Vakhtinskii V. M., Pervoykina K. A. ENGINEERING OF ADENOVIRAL VECTOR CARRYING THE GENE OF HUMAN LACTOFERRICIN 439
Абаева М. Р., Исабек А. У., Мелисбек А. М., Бопи А. К., Шыныбекова Г. О., Кожабергенов Н. С., Алмежанова М. Д., Султанкулова К. Т. ИДЕНТИФИКАЦИЯ *COXIELLA BURNETII* МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ГЕНА 16S РРНК 441
Алрхмун С., Фишер М. С., Лопатникова Ю. А., Перик-Заводская О. Ю., Волынец М. О., Перик-Заводский Р. Ю., Шевченко Ю. А., Назаров К. В., Филиппова Ю. Г., Алсаллум А., Курилин В. В., Силков А. Н., Сенников С. В. УСОВЕРШЕНСТВОВАННАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТИГЕНСПЕЦИФИЧНЫХ TCR....443
Афоничева К. В., Марченко И. В., Смольникова М. В. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА *MAOA* (RS1137070) У ПОДРОСТКОВ С ПРОБЛЕМНЫМ ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЬЮТЕРНЫХ ВИДЕОИГР 445
Бауэр И. А., Жарков Т. Д., Жуков С. А., Коваль О. А., Купрюшкин М. С., Дмитриенко Е. В. 447
ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ МОДИФИКАЦИЙ МЕЖНУКЛЕОТИДНОГО ФОСФАТА НА СВОЙСТВА СИНТЕЗИРУЕМЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ....447
Березкина М. Э., Чернышова Д. О., Нисканен С. А., Виноходов Д. О. ОЦЕНКА ВКЛАДА СИАЛОВЫХ КИСЛОТ В ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУНИТЕТА 449
Боброва Л. А., Земскова М. Ю. ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА С БЕЛКОМ S100P НА ЛИНИИ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА THP-1 451
Бурылова А. Л., Сабуцкий Ю. Е., Менчинская Е. С. БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОГЛИКОЗИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-НАФТОХИНОНА....454
Валиахметова Э. Р., Копеин Д. С., Снитко П. Ф., Литвинова Н. А. ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕРЕНИЯ ПЛАЗМИДНОЙ ДНК МЕТОДОМ ЦИФРОВОЙ КАПЕЛЬНОЙ ПЦР 456
Ведерникова В. О., Спирин П. В., Прасолов В. С. УСТАНОВЛЕНИЕ ВКЛАДА ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX3 В ПОДДЕРЖАНИЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО СТАТУСА КЛЕТОК ЛЕЙКОЗОВ 458
Вьюшков В. С., Ломов Н. А., Рубцов М. А. ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ КОГЕЗИНА В ОГРАНИЧЕНИИ ПОДВИЖНОСТИ ХРОМАТИНА В НОРМЕ И В УСЛОВИЯХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК....459
Гаврилова А. А., Мокин Я. И., Фонин А. В. РОЛЬ ФАЗОВЫХ ПЕРЕХОДОВ БИОПОЛИМЕРОВ В ФОРМИРОВАНИИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИИ А-ТЕЛЕЦ....461
Ганцова Е. А., Деев И. Е., Ельчанинов А. В. НОКАУТ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ IRR ВЛИЯЕТ НА МОРФОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ПОЧКИ МЫШИ 463
Глумакова К. А., Спирин П. В., Прасолов В. С. РОЛЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА E2F1 В РАЗВИТИИ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК ЛЕЙКОЗОВ 465
Голосова Н. Н., Хлусевич Я. А., Кравчук Б. И., Матвеев А. Л., Емельянова Л. А., Тикунова Н. В. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА NS1 ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 467

Горбач А. В., Михаленко Е. П., Кастюкевич Л. И., Романова О. Н., Кильчевский А. В. ОЦЕНКА БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБИОМА ЭНДОСКОПИЧЕСКИ ЗДОРОВОЙ И ПОВРЕЖДЕННОЙ СЛИЗИСТОЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА 469
Гуницева Н. М., Евтеева М. А., Кузьминкова А. А. ПОИСК И ТЕСТИРОВАНИЕ НОВОЙ РНК-НАПРАВЛЯЕМОЙ РНК-НУКЛЕАЗЫ ТИПА VG НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА МЕТАГЕНОМНЫХ ДАННЫХ, ПОЛУЧЕНИЕ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ В ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЛОЖЕНИЯХ 471
Гурьев А. А., Саввина М. Т. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА NBAS В ФИБРОБЛАСТАХ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА И ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ 473
Евланенков К. К. ПИКОВЫЕ И СТАЦИОНАРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ОТВЕТОВ ASIC2A ИМЕЮТ РАЗНУЮ ИОННУЮ СЕЛЕКТИВНОСТЬ 475
Евменов К. С., Володин В. В., Пономарева Н. И., Брезгин С. А., Тихонов А. С., Карандашов И. В., Баюрова Е. О., Житкевич А. Ю., Гордейчук И. В., Чуланов В. П., Костюшев Д. С., Костюшева А. П. РОЛЬ M6A-МОДИФИКАЦИЙ РНК В РАЗВИТИИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ 477
Ермошина А. А., Охальников А. Д., Моторина А. О., Гавриш М. С., Бабаев А. А. ОЦЕНКА ТИПА АКТИВАЦИИ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК И СОСТОЯНИЯ МИТОХОНДРИЙ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА *IN VITRO* 479
Жигулин А. С., Барыгин О. И. АНТИДЕПРЕССАНТ ВОРТИОКСЕТИН ИНГИБИРУЕТ ИОНОТРОПНЫЕ ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ NMDA-ТИПА 481
Жунусов Н. С., Курбатова А. А., Лебедев П. Р., Кушнир С. А., Авраменко А. А., Покровский М. В. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧИСЛА КОПИЙ ТРАНСГЕННОЙ КАССЕТЫ У МЫШЕЙ ЛИНИИ FUS(1-359) 484
Иваненко К. А., Лебедев Т. Д., Прасолов В. С. ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ КОМБИНАЦИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С МИТРАМИЦИНОМ А ДЛЯ ТЕРАПИИ ЛЕЙКОЗОВ 486
Исхакова Э. Р., Суворова И. И. АНАЛИЗ РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ-КАНДИДАТОВ ДЛЯ НОРМАЛИЗАЦИИ ДАННЫХ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР В ДОРМАНТНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТКАХ 487
Кандинов И. Д., Шаскольский Б. Л., Ларкин А. А., Кравцов Д. В., Грядунов Д. А. НОВЫЙ МЕТОД МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ 490
Капитонова М. А., Шабалина А. В., Дедков В. Г., Долгова А. С. РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА *MAMMARENAVIRUS JUNINENSE* НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ RPA 492
Килунов А. В., Булатова Л. Ф., Решетникова Д. Д., Скрипова В. С., Киямова Р. Г., Богданов М. В. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ В БОЛЬШОМ ВНЕКЛЕТОЧНОМ ДОМЕНЕ НАТРИЙ-ЗАВИСИМОГО ФОСФАТНОГО ТРАНСПОРТЕРА NAPI2B 494
Козлов И. Б., Герасимов О. А., Домашева О. Ю., Бушина Л. Г., Федосеева Д. М. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО РНК-ОЛИГОНУКЛЕОТИДА С 5’-ТЕРМИНАЛЬНЫМ ФОСФАТОМ 495
Колесникова М. М., Айриянц К. А., Межлумян Е. В., Бондарь Н. П. ВЛИЯНИЕ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО ВОСПАЛЕНИЯ НА ГЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ И ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-НАДПОЧЕЧНИКОВУЮ СИСТЕМУ САМЦОВ ЛИНИИ BTBR 497
Кононова Д. В., Робустова С. Д., Аитова А. А., Щербина С. А., Слотвицкий М. М., Цвелая В. А., Гусев А. И., Шагимарданова Е. И., Агладзе К. И. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ИПСК-КАРДИОМИОЦИТОВ 499
Копосова О. Н., Казанцева О. А., Шадрин А. М. ПРИМЕНЕНИЕ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДАННЫХ ЭНДОЛИЗИНОВ БАКТЕРИОФАГОВ ГРУППЫ *BACILLUS CEREUS SENSU LATO* 501
Косарев Ю. А., Тимофеева Н. А., Кузнецова А. А., Кузнецов Н. А. РАСЩЕПЛЕНИЕ РНК В СОСТАВЕ МОДЕЛЬНЫХ R-ПЕТЕЛЬ РИБОНУКЛЕАЗОЙ H1 *E. COLI* 503
Кравцов Д. В. ГОНОКОККОВЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ОСТРОВ — МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДРАЙВЕР РАСПРОСТРАНЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИОТИКАМ *NEISSERIA GONORRHOEAE* 504
Кравчук Б. И., Хлусевич Я. А., Чичерина Г. С., Тикунова Н. В., Кечин А. А., Матвеев А. Л. БЕЛОК NS1 ВИРУСА ОМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ 507

Красникова С. И., Шарабрин С. В., Кисакова Л. А., Карпенко Л. И. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ НУКЛЕОТИДОВ НА ИММУНОГЕННОСТЬ МРНК-ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ГРИППА 509
Кулакова М. В., Пахомова М. Д., Бидюк В. А., Агафонов М. О. ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТУ НАТРИЯ ПРИ НАРУШЕНИИ ВАКУОЛЯРНОЙ КАЛЬЦИЕВОЙ АТФАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ РОДА *OGATAEA* СВЯЗАНА С ВХОДОМ КАТИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЬ ИЗ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ 511
Куликов В. В., Щербаков Д. Н., Колосова Е. А. ПОЛУЧЕНИЕ ГЕННО-МОДИФИЦИРОВАННОГО ШТАММА *E. COLI*, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН САХАРАЗЫ SACB, ПРИ ПОМОЩИ МОБИЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ 513
Лебедев Т. Д., Михеева А. М., Богомолов М. А., Семенцов М. В., Gasca V. A., Спирин П. В., Буздин А. А., Прасолов В. С. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ, МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФАЙЛИНГА И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ РЕПОРТЕРОВ 515
Львова И. Д., Сидоренко Д. А., Тыганов С. А., Шарло К. А. НАКОПЛЕНИЕ ВНУТРИМИТОХОНДРИАЛЬНОГО КАЛЬЦИЯ ПРИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РАЗГРУЗКЕ НЕ ОКАЗЫВАЕТ ВЛИЯНИЯ НА РАЗВИТИЕ ПОВЫШЕННОЙ УТОМЛЯЕМОСТИ КАМБАЛОВИДНОЙ МЫШЦЫ 517
Мартюшова В. Г., Тимофеева А. М., Седых С. Е. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТИЛ-ЗАВИСИМЫХ РЕСТРИКТАЗ ДЛЯ АНАЛИЗА МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ УЧАСТКОВ ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С ПАТОГЕНЕЗОМ СИНДРОМА АЛЬЦГЕЙМЕРА 519
Марченко И. В., Афоничева К. В., Смольникова М. В. ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ НАСЕЛЕНИЯ КРАЙНЕГО СЕВЕРА РФ К БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РИСКА 520
Маяк М. А., Джалилова Д. Ш., Макарова О. В. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОГРЕССИИ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИС У МЫШЕЙ С РАЗНОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГИПОКСИИ 522
Мельникова А. И., Краснова Т. С., Рубцов П. М. СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ PAX4, СВЯЗАННЫХ С МОНОГЕННЫМ ДИАБЕТОМ MODY9 524
Меркулов П. Ю., Серганова М. А., Петров Г. А., Киров И. В. ВНЕХРОМОСОМНЫЕ КОЛЬЦЕВЫЕ ДНК РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ РАСТЕНИЙ: СОСТАВ, СТРУКТУРА И ПРОИСХОЖДЕНИЕ, ВЫЯВЛЕННЫЕ НАНОПОРОВЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЕМ 526
Мирошниченко Е. А., Диатроптова М. Н., Ефимушкина А. С., Косырева А. М. ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВРА НА МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКУЮ ХАРАКТЕРИСТИКУ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ ЧЕЛОВЕКА HT-29 528
Михеева А. М., Прасолов В. С., Лебедев Т. Д. ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ КОМБИНАЦИЙ ПРОТИВОРАКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ТРАНСКРИПТОМА ДЛЯ ЛИНИЙ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ И НЕЙРОБЛАСТОМЫ 530
Неклесова М. В., Силонов С. А., Смирнов Е. Ю., Шарипов Р. Р., Сурин А. М., Кузнецова И. М., Туроверов К. К., Фонин А. В. РОЛЬ БЕЛКА ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА ВО ВНУТРИКЛЕТОЧНОМ ТРАНСПОРТЕ КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ 532
Николаев Н. А., Вьюшков В. С., Ломов Н. А. ИССЛЕДОВАНИЕ ПУТЕЙ РЕПАРАЦИИ ДНК, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ОБРАЗОВАНИЕ ХРОМОСОМНОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ *AML1-ETO* 534
Охальников А. Д., Гавриш М. С., Тутукова С. А., Таробыкин В. С. РОЛЬ KCNQ3 В ФОРМИРОВАНИИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И МОЗОЛИСТОГО ТЕЛА 536
Панина Е. А., Бабкин И. В., Федорец В. А., Тикунова Н. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАГОВЫХ DGR-КАССЕТ НА ПРИМЕРЕ ФАГА LMMB 538
Парчайкина М. В., Молчанов И. Д., Чудайкина Е. В., Кузьменко Т. П., Ревина Э. С., Заварыкина А. В., Симакова М. А., Ревин В. В. РОЛЬ МЕТАБОЛИТОВ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ В РЕГУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ПОВРЕЖДЕННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ НЕРВАХ 540
Проскура А. Л., Вечкапова С. О., Сорокоумов Е. Д. МЕХАНИЗМЫ ЭНДОЦИТОЗА АМРА-РЕЦЕПТОРОВ В ПРОЦЕССАХ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА 542
Саковина Л. В., Ендуткин А. В., Жарков Д. О. ИНТЕРФЕРОМЕТРИЧЕСКАЯ РАССЕИВАЮЩАЯ МИКРОСКОПИЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ЭНДОНУКЛЕАЗЫ SPYCAS9 С НАПРАВЛЯЮЩЕЙ SGPHK 544
Селина П. И. ТЕСТИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В МОДЕЛИ *DANIO RERIO* 545

Ситяева Д. В., Стефанова Н. А. СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ МИТОХОНДРИЙ В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА КРЫС OXYS В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ И ВЛИЯНИЕ НА НИХ ЭКЗОГЕННОГО МЕЛАТОНИНА 547
Смирнова Е. О., Окатова А. С., Ланцова Н. В., Егорова А. М., Топоркова Я. Ю., Гречкин А. Н. НЕОБЫЧНЫЙ ФЕРМЕНТ КЛАНА CYP74 ЛАНЦЕТНИКА ЕВРОПЕЙСКОГО 549
Смольянова Н. А., Леконцева Н. В., Никулин А. Д. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ХОЛОДОВОГО ШОКА ИЗ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* С МАЛЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ РНК 551
Смыслов А. Д., Макарченко Р. К., Родин В. А., Лазаревич Н. Л., Зверева М. Э., Рубцова М. П., Донцова О. А., Буренина О. Ю. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ НОВОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК CHOL, АССОЦИИРОВАННОЙ С ХОЛАНГИОКАРЦИНОМОЙ 553
Сокольская С. Я., Мясников Б. П., Гусева Е. А., Камзеева П. Н., Сергиев П. В., Аралов А. В. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ (2'-ДЕЗОКСИ)АДЕНОЗИНЫ И ФЕНОКСАЗИНЫ КАК ИНДУКТОРЫ АУТОФАГИИ 555
Солодовников А. А., Шестакова Е. А., Лавров С. А., Гвоздев В. А. ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА *PROD* НА СТРУКТУРУ ГЕТЕРОХРОМАТИНА ПРИ ЭФФЕКТЕ ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER* *558*
Станкевич Ю. С., Щаюк А. Н., Михаленко Е. П., Горбач А. В., Кильчевский А. В. ТАРГЕТНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ AMPLISEQ FOCUS PANEL ПРИ АДЕНОКАРЦИНОМЕ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ЛЕГКОГО 561
Сунбули Х., Алексеева Л. А., Марков О. В., Сенькова А. В., Савин И. А., Миронова Н. Л. ВЫБОР РЕФЕРЕНСНЫХ ГЕНОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОТ-ПЦР НЕЙТРОФИЛОВ СЕЛЕЗЕНКИ ЗДОРОВЫХ МЫШЕЙ И МЫШЕЙ-ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ 564
Цой Е. А., Евсютина Д. В., Фисунов Г. Ю., Говорун В. М. ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА WHIA У МОЛЛИКУТ В КОНТЕКСТЕ МИНИМАЛЬНОГО ГЕНОМА 566
Чалабов Ш. И., Кличханов Н. К. АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА СИЛИМАРИНА ПРИ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА 567
Шамаев Н. Д., Сальников В. В., Кошпаева Е. С., Сычев К. В. УВЕЛИЧЕНИЕ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НОЗЕМАТОЗОМ ВБЛИЗИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СТРЕССОРА 569
Шарло К. А., Сидоренко Д. А., Львова И. Д., Тыганов С. А., Шенкман Б. С. ЭФФЕКТЫ НАКОПЛЕНИЯ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ПОЗНО-ТОНИЧЕСКИХ МЫШЦАХ ПРИ БЕЗДЕЙСТВИИ 571
Шешукова Е. В., Ершова Н. М., Антимонова А. А., Камарова К. А., Комарова Т. В. КСИЛОГЛЮКАН ЭНДОТРАНСГЛЮКОЗИЛАЗА/ГИДРОЛАЗА *NICOTIANA BENTHAMIANA* (NBXTH19) СОДЕРЖИТ ASN-СВЯЗАННЫЙ ГЛИКАН И УЧАСТВУЕТ В ОТВЕТЕ НА ВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ 573
Шишкина О. Д., Дерюженко М. А., Андреенкова О. В., Бобровских М. А., Шацкая Н. В., Васильев Г. В., Клименко А. И., Коренская А. Е., Грунтенко Н. Е. ШТАММ WMELPLUS БАКТЕРИИ *WOLBACHIA* ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ *DROSOPHILA MELANOGASTER* К ТЕПЛОВОМУ СТРЕССУ, ИЗМЕНЕНИЯ В ТРАНСКРИПТОМЕ ХОЗЯИНА ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО ВЫЗВАНЫ ИЗМЕНЕНИЯМИ В ГЕНОМЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СИМБИОНТА 575
Шхалахова Р. М., Маляровская В. И. ПОИСК ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ И ПЕРЕКРЕСТНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЧАЯ (*CAMELLIA SINENSIS* (L.) KUNTZE) В ОТВЕТ НА ХОЛОД И ЗАСУХУ НА ОСНОВЕ ТРАНСКРИПТОМНОГО АНАЛИЗА 577

Раздел VI. **Фундаментальная медицина**

Bachkova I. K., Chernikov I. V., Sen'kova A. V., Meschaninova M. I., Savin I. A., Vlassov V. V., Zenkova M. A., Chernolovskaya E. L. CHOLESTEROL-CONJUGATED SMALL INTERFERING RNA TARGETING *IL6* ALLEVIATES ACUTE LUNG INJURY IN MICE 579
Danilushkina A. A., Guryanov I. D., Akhatova F. S., Naumenko E. A. INFLUENCE OF THE BACTERIAL PIGMENT PRODIGIOSIN ON THE CYTOSKELETON OF CANCER AND NORMAL CELL LINES 580
Kulebyakina M. A., Butuzova D. A., Basalova N. A., Efimenko A. Yu. DKK3 SECRETED BY MESENCHYMAL STROMAL CELLS PREVENTS FIBROBLAST-TO-MYOFIBROBLAST TRANSITION 581
Manzhulo I. V., Tyrtyshnaia A. A., Egoraeva A. A., Ivashkevich D. N., Manzhulo O. S., Ponomarenko A. I. ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF SYNAPTAMIDE IN TRAUMATIC BRAIN INJURY 582

Novikov M. A. TOXICITY ASSESSMENT OF IRON OXIDE NANOCOMPOSITE....584
Salimon S. S., Marusich E. I., Leonov S. V. THE IMPACT OF MANGIFERIN AND TRANS-CINNAMIC ACID ON THE SURVIVAL AND LIFESPAN OF WILD TYPE N2 BRISTOL AND AAK-2 *CAENORHABDITIS ELEGANS* MUTANT STRAINS UNDER OXIDATIVE STRESS....586
Абдулкадиева М. М., Литвиненко В. В., Слонова Д. А., Собянин К. А., Сысолятина Е. В. ОПТИМАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МЫШИНОЙ МОДЕЛИ ИНФИЦИРОВАННЫХ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* РАН....588
Абубакирова Э. А., Сташкевич Д. С. ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ NOD2 РЕЦЕПТОРА НА РИСК РАЗВИТИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ЯЗВЕННОГО КОЛИТА....591
Агеенко А. Б., Васильева Н. С., Нуштаева А. А., Бывакина А. А., Рихтер В. А., Кулигина Е. В. ДЕЙСТВИЕ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА VV-GMCSF-LACT И РЕКОМБИНАНТНОГО GMCSF НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНОЙ МОДЕЛИ МЫШИНОЙ ГЛИОМЫ....593
Аладьев С. Д., Соколов Д. К., Строкотова А. В., Григорьева Э. В. ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА СОСТАВ И СТРУКТУРУ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ....595
Алексеева Л. А., Филатова А. А., Миронова Н. Л. ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ДНКАЗЫ I И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ВНДНК ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ....597
Алсаллум А., Алрхмун С., Перик-Заводская О. Ю., Фишер М. С., Волынец М. О., Лопатникова Ю. А., Перик-Заводский Р. Ю., Шевченко Ю. А., Филиппова Ю. Г., Соловьева О. И., Завьялов Е. Л., Курилин В. В., Шику Х., Силков А. Н., Сенников С. В. NY-ESO-1 TCR Т-КЛЕТКИ ПРОЯВЛЯЮТ МОЩНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ В МЫШИНОЙ МОДЕЛИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЛАНОМЫ SK-MEL-37....599
Амансахатова Е. Н., Иванов Д. В., Горчаков В. Н. ФИТОМИНЕРАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС КАК ФАКТОР АНТИСТАРЕНИЯ ЧЕРЕЗ ОПТИМИЗАЦИЮ СТРУКТУРЫ И ПОВЫШЕНИЕ ФУНКЦИИ ЛИМФАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ....601
Асякина А. С., Мелконян К. И. РОЛЬ МАТРИКЛЕТОЧНОГО БЕЛКА ПЕРИОСТИНА НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ....604
Аулова К. С., Невинский Г. А. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРИ СПОНТАННОМ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА У МЫШЕЙ ЛИНИЙ 2D2, ТН И ГИБРИДОВ ПЕРВОГО ПОКОЛЕНИЯ....606
Баландина С. Э., Беляева С. В., Сташкевич Д. С. ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА TNF-A G-308A У БОЛЬНЫХ COVID-19 РУССКИХ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ....608
Башарова К. С., Безрукова А. И., Байдакова Г. В., Копытова А. Э., Николаев М. А., Милюхина И. В., Захарова Е. Ю., Пчелина С. Н., Усенко Т. С. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА СИНУКЛЕИНОПАТИЙ. ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИНГИБИТОРОВ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ LRRK2 ДЛЯ ПРЕЦИЗИОННОЙ ТЕРАПИИ СИНУКЛЕИНОПАТИЙ....611
Безрукова А. И., Башарова К. С., Руденок М. М., Байдакова Г. В., Милюхина И. В., Захарова Е. Ю., Сломинский П. А., Пчелина С. Н., Усенко Т. С. MTOR-ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *GBA1*....613
Бережной А. К., Слотвицкий М. М., Паршин Д. А., Селиванов А. С., Демин А. Г., Калинин А. И., Наумов В. Д., Синицына А. П., Сыровнев В. А., Кириллова В. С., Аитова А. А., Цвелая В. А., Агладзе К. И. РАЗРАБОТКА ИНСТРУМЕНТА СЕГМЕНТАЦИИ ПРЕДСЕРДИЙ НА МРТ-СНИМКАХ В РАМКАХ СОЗДАНИЯ СИСТЕМЫ КОРРЕКТИРОВКИ АБЛЯЦИИ....615
Боева О. С., Пашкина Е. А., Козлов В. А. ИЗМЕНЕНИЕ БАЛАНСА ВРОЖДЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ....617
Борисевич В. И., Боева О. С., Пашкина Е. А. ЭКСПРЕССИЯ «НЕКЛАССИЧЕСКИХ» МОЛЕКУЛ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ....619
Брит П. И., Меламуд М. М., Бобрик Д. В., Ефремов И. С., Ахметова Е. А., Асадуллин А. Р., Невинский Г. А., Бунева В. Н., Ермаков Е. А. ИЗМЕНЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АЛКОГОЛЬНЫМ АБСТИНЕНТНЫМ СИНДРОМОМ В ПЕРВЫЕ ПЯТЬ ДНЕЙ ГОСПИТАЛИЗАЦИИ И ИХ СВЯЗЬ С ПСИХИЧЕСКОЙ СИМПТОМАТИКОЙ....621
Вахрушев Н. С., Карпов А. А., Калинина О. В. СЕКВЕНИРОВАНИЕ РНК ЛЕГКИХ ПОКАЗАЛО НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ НА КРЫСИНОЙ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ТРОМБОЭМБОЛИЧЕСКОЙ ЛЕГОЧНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ....623

Веденкин А. С., Стовбун С. В., Бухвостов А. А., Кузнецов Д. А. ПРИРОДНЫЕ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ УЛЬТРАКОРОТКИЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ПОЛИДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДЫ — ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТОВ РЕПАРАЦИИ ДНК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК 625
Головачева У. Е. ВОССТАНОВЛЕНИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ШОВНОГО МАТЕРИАЛА, МОДИФИЦИРОВАННОГО L-АРГИНИНОМ 627
Головкин И. О., Маслова Г. В., Пилявский Н. Н., Макалиш Т. П. ПРИМЕНЕНИЕ АНТИСМЫСЛОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РЕВМАТОИДНОГО АРТРИТА 629
Горская А. В. СТРЕПТОЗОТОЦИН-НИКОТИНАМИД-ИНДУЦИРОВАННЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 2 ТИПА СНИЖАЕТ ОБОНЯТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ КРЫС....631
Грифлюк А. В., Постникова Т. Ю., Зайцев А. В. ФЕБРИЛЬНЫЕ СУДОРОГИ ВЫЗЫВАЮТ НАРУШЕНИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ В ГИППОКАМПЕ КРЫС, СОПРОВОЖДАЮЩИЕСЯ УХУДШЕНИЕМ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ 633
Гусев И. А. КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ НЕОНАТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НЕОПИАТНОГО АНАЛОГА ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА В МИОКАРДЕ ИНФАНТИЛЬНЫХ САМОК БЕЛЫХ КРЫС С НЕБЛАГОПРИЯТНЫМ ВНУТРИУТРОБНЫМ ПЕРИОДОМ, ПОДВЕРГНУТЫХ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ....635
Гусельникова В. В., Кирик О. В., Никитина И. А., Разенкова В. А., Федорова Е. А., Павлова В. С., Коржевский Д. Э. НОВЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ....637
Данильченко В. Ю., Панина Е. А., Зыцарь М. В., Маслова Е. А., Орищенко К. Е., Посух О. Л. СПЛАЙСИНГОВЫЕ ВАРИАНТЫ В ЭТИОЛОГИИ МОНОГЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: ВАРИАНТЫ В ГЕНЕ *SLC26A4*, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОТЕРЕЙ СЛУХА 639
Дергачева Н. И., Сучкова И. О., Сасина Л. К., Паткин Е. Л. ВОЗДЕЙСТВИЕ ХЛОРИДА КАДМИЯ В ТЕЧЕНИЕ 48 И 72 ЧАСОВ ВЛИЯЕТ НА МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК HEPG2 И HEK293 641
Дёмина А. В., Грязнова М. О., Шварц А. П., Зайцев А. В. АНАКИНРА ВОССТАНАВЛИВАЕТ ФУНКЦИИ ПАМЯТИ, АССОЦИИРОВАННОЙ СО СТРАХОМ, НО НЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ПАМЯТИ У КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ 643
Диеспиров Г. П., Постникова Т. Ю., Зайцев А. В. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ГИППОКАМПЕ КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ 646
Дронь М. Ю., Барыгин О. И., Мальцев Д. В., Диваева Л. Н., Зубенко А. А., Спасов А. А. ПОИСК ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВ АНТАГОНИСТОВ NMDA- И AMPA-РЕЦЕПТОРОВ В РЯДУ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНОКСАЛИНА И ПИРАЗИНОБЕНЗИМИДАЗОЛА....648
Егораева А. А., Манжуло И. В., Пономаренко А. И., Ивашкевич Д. Н. ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭТАНОЛАМИДА СТЕАРИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ТЕРАПИИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ ЛЕГКОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ 651
Егоров А. Н., Готовцев Р. А., Троев И. П. АПОПТОЗ-ИНДУЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА *PHLOJODICARPUS SIBIRICUS* ПО ОТНОШЕНИЮ К КЛЕТКАМ МЕЛАНОМЫ МЫШИ 653
Закуражная В. И., Цурина А. М. ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИМЕНИМОСТИ СКАНИРУЮЩЕЙ ТЕРМОГРАФИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РЕАКЦИЙ СТРЕССА ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ....655
Иванова А. А., Апарцева Н. Е., Каширина А. П., Немцова Е. Г., Иванова Ю. В., Кручинина М. В., Курилович С. А., Максимов В. Н. АССОЦИАЦИЯ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА *SLCO1B1* С ФЕНОТИПОМ СИНДРОМА ЖИЛЬБЕРА 658
Ивашкевич Д. Н., Манжуло И. В., Пономаренко А. И., Дюйзен И. В. ГЕПАТОПРОТЕКТИВНОЕ И АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДОБАВКИ НА ОСНОВЕ ОЛЕОИЛЭТАНОЛАМИДА НА МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНО-ИНДУЦИРОВАННОГО ОЖИРЕНИЯ У МЫШЕЙ....660
Иерусалимский Н. В., Каримова Е. Д., Самотаева И. С. ПАРАМЕТРЫ ОБЪЕМОВ КОРКОВЫХ И ПОДКОРКОВЫХ ОБЛАСТЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНЫМ ДЕПРЕССИВНЫМ ЭПИЗОДОМ ПОСЛЕ COVID-19 И БЕЗ COVID-19 662
Исаев Н. Р., Юсуповская Е. А., Телышев Д. В., Марков А. Г. СТИМУЛЯЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВОВ С ПОМОЩЬЮ ИМПЛАНТИРУЕМОЙ МАНЖЕТЫ НА БАЗЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛУПРОВОДНИКОВ 664

Исакова А. А., Гаспарян М. Э., Долгих Д. А., Яголович А. В. МУЛЬТИМОДАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ЦИТОКИНА TRAIL С АНТИАНГИОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ 665
Кисакова Л. А., Кисаков Д. Н., Яковлев В. А., Шарабрин С. В., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Тигеева Е. В., Рудометов А. П., Ильичев А. А., Карпенко Л. И. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОГЕННОСТИ МРНК-КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ RBD БЕЛКА S ВИРУСА SARS-COV-2 И ГЕМАГГЛЮТИНИН ВИРУСА ГРИППА ТИПА А (H1N1), ДОСТАВЛЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАГНИТНЫХ И ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ 667
Кобякова М. И., Сенотов А. С., Ломовская Я. В., Краснов К. С., Фетисова Е. И., Фадеев Р. С. ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВАЦИЯ ПОДАВЛЯЕТ TRAIL-ИНДУЦИРОВАННЫЙ АПОПТОЗ КЛЕТОК ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА 669
Колосова Е. А., Колосов П. В., Щербаков Д. Н. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ ПЕПТИДОВ БЛОКИРОВАТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛИГАНД-РЕЦЕПТОР НА ПРИМЕРЕ КОРЕГУЛЯТОРНЫХ МОЛЕКУЛ CTLA4-B7-2 671
Любушкина Е. М., Бондарева Е. А., Солдатова М. С., Ярославцев Д. В. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДОМИМЕТИКА КАМП-1 674
Макарова С. В., Булина Н. В., Хвостов М. В., Бородулина И. А. ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИ-ИОННОГО ЗАМЕЩЕНИЯ В СТРУКТУРЕ ГИДРОКСИАПАТИТА НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МАТЕРИАЛА 676
Макеев М. А., Халимов Р. И., Паравина Е. В. ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПИРАЗОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ 678
Марасаева Е. А. ИНГИБИТОРЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ В ПРОФИЛАКТИКЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА: ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ *IN VITRO* 680
Менчинская Е. С., Чингизова Е. А., Пислягин Е. А., Сильченко А. С. МЕХАНИЗМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ ГОЛОТУРИИ *CUCUMARIA DJAKONOVI* В ОТНОШЕНИИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА 682
Мокроусов А. Д., Антосюк О. Н., Ляхова А. Н. ТЕСТИРОВАНИЕ ЭКСТРАКТА *BETONICA OFFICINALIS* L. В ОТНОШЕНИИ ИНТЕНСИВНОСТИ ВАКУОЛИЗАЦИИ И ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER* 684
Мосалев К. И., Абышев А. А., Котова М. В., Карпов М. А., Мирошниченко С. М., Пыхтина М. Б. РАНОЗАЖИВЛЯЮЩИЙ ЭФФЕКТ РЕКОМБИНАНТНОГО ГМ-КСФ И ЕГО ХИМЕРНОЙ ФОРМЫ НА МОДЕЛИ ОЖОГОВЫХ РАН КРЫСЫ 686
Недорубова И. А., Черномырдина В. О., Меглей А. Ю., Басина В. П., Миронов А. В., Трифанова Е. М., Васильев А. В., Попов В. К., Гольдштейн Д. В., Кулаков А. А., Бухарова Т. Б. ГЕН-АКТИВИРОВАННЫЕ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ 3D-ПЕЧАТИ, СОДЕРЖАЩИЕ АДЕНОВИРУСНЫЕ КОНСТРУКЦИИ С ГЕНОМ *BMP2* 688
Очнева А. Г., Зоркина Я. А., Абрамова О. В., Закуражная В. И., Ушакова В. М., Зубков Е. А., Морозова А. Ю., Гурина О. И. TDP-43 И НЕЙРОГРАНИН В ПЛАЗМЕ КРОВИ КАК БИОМАРКЕРЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ БОЛЕЗНИ АЛЬГЕЙМЕРА 690
Паравина Е. В., Макеев М. А., Халимов Р. И. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛД50 СУБСТАНЦИИ ЯДА ГАДЮКИ ОБЫКНОВЕННОЙ, ВЫРАЩЕННОЙ В НЕВОЛЕ 692
Попова В. К., Дмитриенко Е. В. КАЛЬЦИЙ КАРБОНАТНЫЕ МАТРИКСЫ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ 694
Приходько В. А., Алексеева Ю. С., Захлевная Д. А., Болотова В. Ц., Оковитый С. В. ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА СПАРЖИ КИСТЕВИДНОЙ НА МИОТРОПНЫЙ ЭФФЕКТ АЭРОБНОГО ТРЕНИРОВОЧНОГО РЕЖИМА У МЫШЕЙ 696
Пронькина А. А., Елистратов Д. Г., Косова А. М. РОЛЬ ОСТЕОБИОТИКОВ В ПРОФИЛАКТИКЕ ОСТЕОПОРОЗА И ОБРАЗОВАНИЯ КОСТНЫХ ПОЛОСТЕЙ НА ФОНЕ ПРИЕМА АНТИБИОТИКОВ 698
Пыхтунова Е. А., Золотарев А. А., Ксенева С. И., Удут В. В. ПЕРСПЕКТИВЫ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ КАРДИОВАСКУЛЯРНОЙ НЕЙРОПАТИИ МЕТОДОМ СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ СЕРДЕЧНОГО РИТМА 700
Радченко Н. С., Ильчибаева Т. В., Науменко В. С. ЧАСТИЧНОЕ СТРУКТУРОСПЕЦИФИЧНОЕ ПОДАВЛЕНИЕ 5-НТ4 РЕЦЕПТОРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ МЕХАНИЗМ КОРРЕКЦИИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЙ 702

Риппинен Д. В., Соловьева И. М., Овчинников В. С., Ярославцев Д. В., Алексеев А. Ю., Скорупо А. С., Соловьева А. О. КОМПОЗИТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ПЕПТИДОМИМЕТИКА ДЛЯ ТЕРАПИИ РАН, ОСЛОЖНЕННЫХ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОЙ ФЛОРОЙ 704
Робустова С. Д., Турчанинова Е. А., Джабраилов В. Д., Кононова Д. В., Аитова А. А., Цвелая В. А., Агладзе К. И. РАЗРАБОТКА ИНФАРКТНОЙ МОДЕЛИ КРЫСИНОГО СЕРДЦА ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ 706
Рысцов Г. К., Антипова Т. В., Шляпников М. Г., Ренфельд Ж. В., Земскова М. Ю. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ PENICILLIUM THYMICOLA ФУМИХИНАЗОЛИНА F И G 708
Саргсян К. Т., Слесарев О. В., Комарова М. В. АНАТОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРАНИОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ХИРУРГИИ 710
Сафарян С. М., Нифонтова Г. О., Ефремов Ю. М., Зубанова Е. М., Голубева Е. Н., Костюк С. В., Березянко И. А., Тимашев П. С., Шпичка А. И. РАЗРАБОТКА ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОЙ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ КАК ОСНОВНОГО КОМПОНЕНТА РАНЕВЫХ ПОВЯЗОК 712
Силина М. В., Джалилова Д. Ш., Гринь О. О., Бабаев М. А., Макарова О. В. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ЭКСПРЕССИИ *HIF1A* И *NFKB1* И СОДЕРЖАНИЯ БЕЛКОВ HIF-1A И VNN1 У ПАЦИЕНТОВ КАРДИОХИРУРГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ 714
Сорокина Л. Е., Фомочкина И. И., Кубышкин А. В. МОДУЛЯЦИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТИМУЛЯЦИИ ДОРСАЛЬНОГО ГИППОКАМПА 716
Суркова Р. С., Марасаева Е. А., Собенин И. А., Орехов А. Н. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ НЕ ВЛИЯЮТ НА АТЕРОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОПРОТЕИДОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ 718
Тахауов А. Р., Тахауова Л. Р., Смаглий Л. В., Калинкин Д. Е. РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ОСТРЫМ ИНФАРКТОМ МИОКАРДА У РАБОТНИКОВ ОБЪЕКТОВ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АТОМНОЙ ЭНЕРГИИ 720
Тигеева Е. В., Шабурова Е. В., Кисаков Д. Н., Боргоякова М. Б., Старостина Е. В., Яковлев В. А., Кисакова Л. А., Рудометова Н. Б., Рудометов А. П., Карпенко Л. И. УСИЛЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ ЗА СЧЕТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЙСЕРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В СОСТАВЕ ПОЛИЭПИТОПНЫХ Т-КЛЕТОЧНЫХ ИММУНОГЕНОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 722
Ушакова В. М., Зоркина Я. А., Абрамова О. В., Барыкин Е. П., Зубков Е. А., Очнева А. Г., Валихов М. П., Ванеев А. Н., Митькевич В. А., Гурина О. И., Чехонин В. П., Морозова А. Ю. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИЗОМЕРИЗОВАННОЙ ФОРМЫ В-АМИЛОИДА ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ СИМПТОМОВ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА 724
Филиппова Ю. Г., Шевченко Ю. А., Фишер М. С., АЛРХМУН С., Перик-Заводский Р. Ю., Перик-Заводская О. Ю., Лопатникова Ю. А., Курилин В. В., Волынец М. О., Алсаллум А., Завьялов Е. Л., Соловьева О. И., ШИКУ Х., Силков А. Н., Сенников С. В. ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА GD2-СПЕЦИФИЧНЫХ CAR Т-КЛЕТОК *IN VITRO* И *IN VIVO* 726
Фишер М. С., Курилин В. В., Сенников С. В. ИНДУКЦИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ТОЛЕРОГЕННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ 728
Фурса Г. А., Чадин А. В., Карсунцева Е. К., Воронова А. Д., Шишкина В. С., Каршиева С. Ш., Степаненко А. А., Сенатов Ф. С., Степанова О. В., Чехонин В. П. СРАВНЕНИЕ БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКТОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЕЙ КОЛЛАГЕНА И ФИБРИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ КИСТ СПИННОГО МОЗГА 730
Харисова А. Р., Синяк Д. С., Захарова М. В., Зубарева О. Е., Зайцев А. В. ВЛИЯНИЕ АНАКИНРЫ, ЛАМОТРИДЖИНА И ИХ КОМБИНАЦИИ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАРУШЕНИЯ У КРЫС В ЛИТИЙ-ПИЛОКАРПИНОВОЙ МОДЕЛИ ВИСОЧНОЙ ЭПИЛЕПСИИ 732
Цуран Д. В., Золотарев А. А., Наумов С. С., Евтушенко Д. Н., Удут Е. В. ГИПОКОАГУЛЯЦИОННЫЕ ЭФФЕКТЫ КРАТКОВРЕМЕННЫХ ХЕ/O_2 ИНГАЛЯЦИЙ 734
Чернопятов Д. И., Никонов С. Д., Нимаев В. В. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИНА Е6 В КОЖЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ЛАЗЕРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ 735

Чжэн Вэньцзин, Разумов И. А. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ОКСИДОВ БИОГЕННЫХ МЕТАЛЛОВ ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛЯХ *IN VITRO* 737
Чумачёва Ю. В., Сташкевич Д. С., Шмелькова Д. М. КОМБИНАЦИИ ГЕНОТИПОВ SNPS TNFRSF11B И TNFA У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ РУССКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛЯБИНСКОЙ ОБЛАСТИ....739
Шутко Е. В., САЛЛУМ Г., Брызгунова О. Е., Мурина Е. А., Остальцев И. А., Пак С. В., Лактионов П. П., Коношенко М. Ю. ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ МИКРОРНК МОЧИ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ 741
Язгарова Р. Р., Биккузин Т. И. МИКРОБИОМ И МИКРОБИОТА ГЛАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТИ В НОРМЕ У ЧЕЛОВЕКА 743
Яковлев В. А., Боргоякова М. Б., Тигеева Е. В., Кисаков Д. Н., Кисакова Л. А., Карпенко Л. И. БУСТЕРНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ МЫШЕЙ КАНДИДАТНОЙ ПОЛИЭПИТОПНОЙ ДНК-ВАКЦИНОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТРУЙНОЙ ИНЖЕКЦИИ ПРИВОДИТ К ЗНАЧИТЕЛЬНОМУ УСИЛЕНИЮ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА 745

Указатель авторов....747

Научное издание

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

Сборник тезисов

Ответственная за выпуск *П. И. Юрганова*
Корректоры *Ю. С. Елисеева, Н. А. Егина, Д. И. Ковалёва, П. И. Юрганова*
Верстка *А. С. Терёшкиной*
Обложка *Е. В. Неклюдовой*

Подписано к опубликованию 12.11.2024 г.
Формат 60 × 84 1/8. Уч.-изд. л. 97,5. Усл. печ. л. 90,6.
Заказ № 209.
Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.

ВЕКТОР

ДВИЖЕНИЕ ВПЕРЕД.
50 лет инноваций в борьбе с вирусами

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» отмечает 50-летний юбилей — пять десятилетий на передовой вирусологии и биотехнологий, пять десятилетий борьбы с невидимыми врагами и спасения жизней по всему миру.

Как все начиналось: история и миссия «Вектора»

Основанный в 1974 году, «Вектор» был создан в рамках Постановления Правительства СССР как Всесоюзный научно-исследовательский институт молекулярной биологии.

Основная задача, поставленная перед институтом в те годы, состояла в изучении фундаментальных особенностей структуры и функции вирусов, а также в разработке вакцинных и диагностических препаратов с использованием новейших достижений генной инженерии.

В 1976 году директором института по научной работе был назначен Лев Степанович Сандахчиев. В 1982 году Лев Сандахчиев возглавил институт и был его бессменным директором до 2005 года. За это время он вывел «Вектор» в число ведущих научных учреждений России и мира, заложил основы новых научных подходов в молекулярной биологии и генной инженерии и воспитал целый ряд своих последователей, которые и по сей день работают на благо российской науки.

Благодаря усилиям Льва Сандахчиева на базе «Вектора» был создан Сотрудничающий центр ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музей штаммов и ДНК вируса оспы. Под его руководством впервые в стране была выделена транспортная РНК, и СССР стал вторым государством, справившимся с задачей расшифровки структуры тРНК. Л. С. Сандахчиев организовал первое в России производство рекомбинантного интерферона, вакцины против гепатита А и наборов для диагностики ВИЧ-инфекции и гепатита В.

С тех пор миссия «Вектора» неизменно заключается в научном и практическом обеспечении противодействия глобальным инфекционным угрозам. В 1994 году «Вектору» был присвоен статус государственного научного центра, который сохраняется и по сей день.



Победы в битве с вирусами

ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора является одним из крупнейших вирусологических центров, специализирующихся на изучении таких вирусов, как вирус натуральной оспы, Марбург, Эбола, вирус клещевого энцефалита, коронавирус SARS-CoV-2, а также патогенов, вызывающих социально значимые болезни.

Сотрудники «Вектора» принимали активное участие в ликвидации вспышки болезни, вызванной вирусом Эбола, в Западной Африке в 2014–2016 годах, за что были удостоены более 20 правительственных наград.

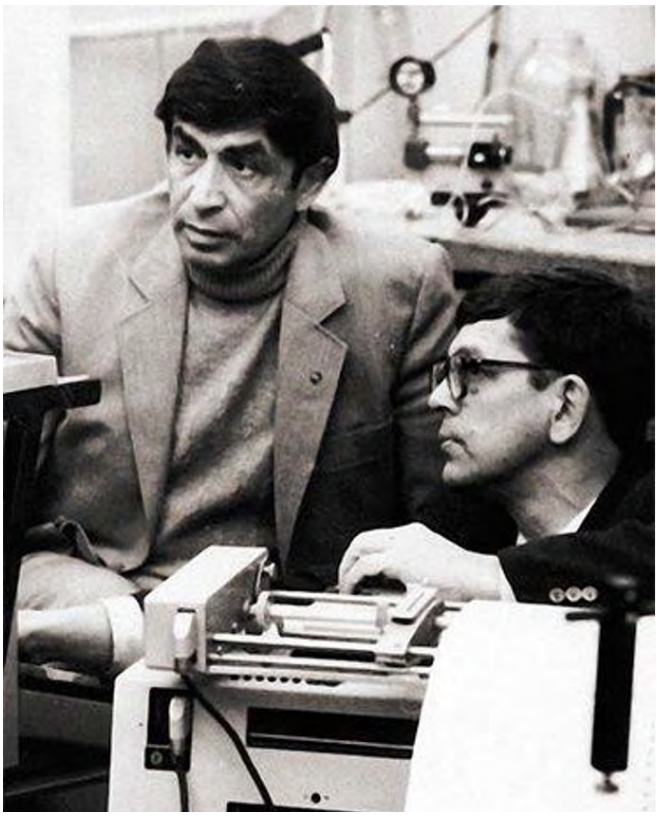


Важным этапом в развитии центра стало противодействие пандемии COVID-19, когда «Вектор» в кратчайшие сроки разработал и внедрил в производство более 20 диагностических наборов для выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2, включая ПЦР-наборы и реагенты для иммуноферментного анализа.

В 2022 году были зарегистрированы вакцины четвертого поколения для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций «ОртопоксВак», а также первый в России специфический противооспенный препарат «АНТИПОКСВИР» (НИОХ-14).

Продолжается разработка тест-систем для экспресс-диагностики «у постели больного». В центре создано пять тест-систем, основанных на изотермической амплификации с детекцией в режиме реального времени, позволяющих выявлять ДНК или РНК. Хроматографическая тест-система, разработанная для дифференциальной диагностики ортопоксвирусов, позволяет в течение 35 минут выявить вирусы натуральной оспы и оспы обезьян.





Международное признание

С 1997 года на базе «Вектора» функционирует один из двух существующих в мире сотрудничающих центров ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музей штаммов и ДНК вируса натуральной оспы.

В 2009 году ГНЦ ВБ «Вектор» был назначен референс-лабораторией ВОЗ по гриппу H5, а в 2021 году получил статус сотрудничающего центра ВОЗ по изучению вирусов гриппа в точках пересечения экосистем людей и животных.

В 2020 году «Вектор» был назначен ВОЗ референс-лабораторией, обеспечивающей подтверждающее тестирование на COVID-19, а в 2024 году стал референс-лабораторией Сети ВОЗ по коронавирусам (CoViNet).

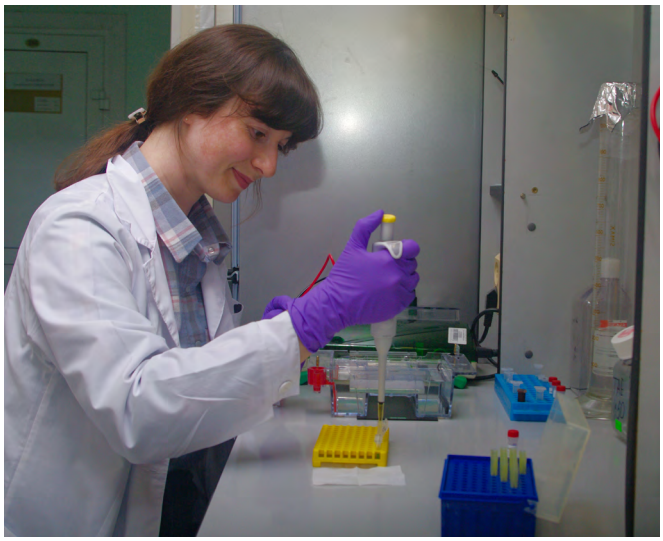
В рамках программ по содействию международному развитию, финансируемых Правительством Российской Федерации, «Вектор» осуществляет активное научно-практическое сотрудничество и оказывает помощь в противодействии инфекционным болезням в странах ближнего и дальнего зарубежья, включая Гвинею, Вьетнам, Венесуэлу, Бурунди, Киргизию, Таджикистан, Туркменистан и Армению. Эти достижения подтверждают высокий международный статус «Вектора» и его значимость для глобального здравоохранения.



Визит сотрудников «Вектора» в Индию (1996 г.)

Взгляд в будущее: современные исследования и новые горизонты

Уникальная научно-экспериментальная база, не имеющая аналогов в Российской Федерации, многопрофильность по изучаемым вирусам и комплексность в методологиях позволяют «Вектору» решать любые научные задачи — от выделения и изучения биологических свойств возбудителей особо опасных вирусных инфекций до разработки и производства диагностических, профилактических и терапевтических препаратов.



В 2019 году на базе «Вектора» создан Центр геномных исследований мирового уровня, в котором проводятся исследования в области молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций, связи структуры и функции вирусных геномов и механизмов патогенеза инфекционных заболеваний в консорциуме с научными организациями Роспотребнадзора. В рамках программы «Виром России» ученые «Вектора» обнаружили несколько десятков новых вирусов и впервые описали их биологические свойства.

Успех «Вектора» складывается из усилий высококвалифицированных сотрудников различных подразделений центра, направленных на достижение общих целей: улучшение состояния здравоохранения в стране путем получения новых знаний о вирусах и их внедрения в разработки новых средств диагностики, профилактики и лечения вирусных заболеваний.



Визит делегации ВОЗ (2014 г.)





Итог: 50 лет побед

За 50 лет своего существования ГНЦ ВБ «Вектор» утвердился как ведущий научный центр в области вирусологии и биотехнологий. Сегодня «Вектор» продолжает оставаться на передовой научного прогресса, решая сложные задачи по противодействию новым биологическим угрозам. Впереди у центра новые вызовы и достижения, которые, без сомнения, будут не менее значимыми, чем уже пройденный путь.



Изначально OpenBio — небольшая конференция молодых ученых ГНЦ ВБ «Вектор». Сегодня же это масштабный международный форум, объединяющий науку и производство. В этот особенный, юбилейный для «Вектора» год мы рады представить наши достижения, наметить планы на следующие 50 лет и собраться вместе с коллегами, которые начинали свой трудовой путь в нашем центре, работали со Львом Сандахчиевым, с теми, кому удалось сохранить и продолжить дело этого выдающегося ученого, академика РАН.



Александр Петрович Агафонов,
генеральный директор ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Роспотребнадзора, доктор биологических наук

OPENBIO — РОССИЙСКИЙ ФОРУМ БИОТЕХНОЛОГИЙ

исследования | инновации | развитие бизнеса в сфере lifescience

Площадка открытых коммуникаций OpenBio — комплекс мероприятий, посвященных коммерциализации идей и развитию бизнеса в сфере наук о жизни.



НАУЧНАЯ 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

OPENBIO.RU

LIFESCIENCE EVENT

ISBN 978-5-4437-1691-6