

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

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2015

УДК 577.2:62.01:578+(001)

ББК 28.07:30.16:28.4

М431

М431 II Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2015 : Сб. тез. / Новосиб. гос. ун-т. — Новосибирск : РИЦ НГУ, 2015. — 224 с.

ISBN 978-5-4437-0438-8

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2015.

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

Тезисы публикуются в авторской редакции.

УДК 577.2:62.01:578+(001)

ББК 28.07:30.16:28.4

ISBN 978-5-4437-0438-8

© АНО «Инновационный центр
Кольцово», 2015

РАЗДЕЛ 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕСТНЫХ ИЗОЛЯТОВ
BACILLUS THURINGIENSIS КАК ЭКОЛОГИЧЕСКИ
БЕЗОПАСНЫХ АГЕНТОВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ**

М. И. Камбаралиева, О. А. Федорова, Е. Б. Магай, А. М. Мавжудова

Институт микробиологии АН РУз, Ташкент, Узбекистан

В настоящее время ассортимент микробиологических средств биоконтроля вредителей сельскохозяйственных культур и объемы их применения значительно уступают экологически опасным химическим пестицидам. Среди микробиологических средств защиты растений наиболее широко используются биопрепараты на основе энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Белковые кристаллы, или δ -эндотоксины обуславливают, главным образом, инсектицидную активность *Bt*, хотя многие штаммы этого вида продуцируют и другие физиологически активные соединения: термостабильный β -экзотоксин, лецитиназу (фосфолипаза С), протеазы, хитиназы и так называемые VIP-токсины, белки, секретируемые во время фазы вегетативного роста клеток *Bt*. В последние годы открылись новые возможности применения данной бактерии и ее токсинов. Рядом ученых показана антимикробная активность δ -эндотоксинов *Bt* в отношении различных бактерий и микроскопических грибов, в том числе и фитопатогенных — возбудителей основных болезней сельскохозяйственных культур. Это позволяет расширить область практического применения *Bt*, особенно в хлоп-

ководческих хозяйствах республики Узбекистан, где в последние годы отмечается нарастание поражения районированных сортов хлопчатника вертициллезным и фузариозным вилтом, вызываемым грибами *Verticillium dahliae* Kleb. и *Fusarium oxysporum* f. sp. *vas-infectum*. Целью настоящего исследования явился поиск и отбор местных изолятов бактерий *Bt*, антагонистически активных в отношении возбудителей грибных болезней хлопчатника — вертициллезного и фузариозного вила.

С целью пополнения коллекционного фонда местных изолятов *Bt* и выявления потенциальных природных резервуаров энтомопатогенных бактерий были исследованы посевные участки Ташкентской области под различными сельскохозяйственными культурами в ширкатных хозяйствах Паркентского и Кибрайского туманов, посевы хлопчатника Юкори-Чирчикского и Урта-Чирчикского туманов, биологической лаборатории Урта-Чирчикского тумана и Ташкентского Аграрного Университета, некоторые горные и речные массивы, а также продуктовые склады.

Свыше 160 биологических образцов (почва, песок, вода, больные и погибшие насекомые, птичий помёт, поражённые насекомыми растения и зерновые продукты) были отобраны и подвергнуты микробиологическому анализу (Табл. 1). Из них 147 собранных образцов — это больные и погибшие насекомые на разных стадиях развития. У всех собранных особей регистрировали клинические признаки заболевания, такие как отсутствие реакции на механическое раздражение, изменение цвета тела насекомого, размягчение и разрывы кожных покровов. В общем количество собранных насекомых вошли как вредные насекомые (например, хлопковая и озимая совка), так и полезные (например, божья коровка). В результате микробиологического анализа гомогенатов выделено 22 культуры местных изолятов кристаллообразующих бактерий *Bt*. Исследования показали, что изученный биологический материал неравнозначен в отношении выделения из него кристаллообразующих бактерий. Личинки вошинной моли занимают первое место среди изученных насекомых по количеству выделенных из них местных штаммов *Bt*. Общее количество штаммов, выделенных из этих насекомых, составляет 5. На втором месте — имаго габрабракона и личинки хлопковой совки, из них выделено по 4 штамма кристаллоо-

бразующей бактерии. Из чернотелки, непарного шелкопряда выделено по 2 штамма, из трупов божьей коровки, озимой совки, кузнечика, колорадского жука и неидентифицированных личинок — по одному штамму. Из образцов почвы выделено 2 штамма, из птичьего помёта и растений, поврежденных насекомыми-вредителями — по одному штамму. Исследования нетрадиционных образцов, таких как птичий помёт, позволили утверждать о расширении бациллоносительства данной группы бактерий *Bt* в природе.

Таблица 1

Источники выделения новых изолятов *Bt*

Источник выделения	Количество изученных образцов	Количество выделенных штаммов	Номер выделенных штаммов
Вошинная моль (<i>Galleriae mellonella L.</i>)	20	5	T115-1, T115-23, T115-24, T115-25, T115-26
Божья коровка (<i>Coccinella septempunctata</i>)	6	1	T115-21
Габрабракон (<i>Habrabracon</i>)	32	4	T115-2, T115-3, T115-4, T115-9
Хлопковая совка (<i>Heliothis obsoleta F.</i>)	28	4	T115-5, T115-6, T115-7, T115-8
Озимая совка (<i>Agrotis segetum S.</i>)	6	1	T115-9
Чернотелка (<i>Tenebrio molitor sp.</i>)	18	2	T115-10, T115-11
Кузнечик (<i>Tetligonia viridissinna sp.</i>)	3	1	T115-12
Колорадский жук (<i>Leptinotansa decemlineata L.</i>)	10	1	T115-13

Окончание табл. 1

Непарный шелкопряд (<i>Lymantria dispar</i>)	13	2	T115-14, T115-15
Неидентифицированные личинки	11	2	T115-16, T115-17
Смыв с листа, поврежденного насекомыми-вредителями	5	1	T-115-22
Образцы почвы	10	2	T115-18, T115-19
Птичий помет	5	1	T115-20
Общее количество	167	26	

Несмотря на достаточно малую выборку исследуемых образцов, прослеживается чёткая закономерность распространения кристаллообразующих бактерий. Полученные результаты коррелируют с литературными данными, указывающими на то, что больные и погибшие насекомые являются наиболее вероятными источниками выделения кристаллообразующих бактерий и служат благоприятными природными резервуарами *Bt*.

Помимо 26 новых изолятов для проведения первичного скрининга культур по отношению к возбудителям вертициллезного и фузариозного вилта хлопчатника было обновлено свыше 100 местных штаммов бактерий *Bt* коллекционного фонда Института микробиологии АН РУз. Методом блоков было подтверждено о наличии у местных изолятов энтомопатогенной бактерии *Bt* выраженных антифунгальных свойств по отношению к фитопатогенам хлопчатника — грибам *Verticillium dahliae* и *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum*. Установлено, что местные изоляты являются активными антагонистами изученных штаммов грибов. Согласно литературным данным, одним из возможных механизмов антифунгального действия *Bt* (а также других бацилл) является их способность утилизировать мицелий и клеточные стенки грибов-фитопатогенов за счет хитиназ и протеаз — внеклеточных литических ферментов. В результате проведения первичного скрининга отобрано 18 культур наиболее активных в отношении — грибов-фитопатогенов, с диаметром зоны подавления роста грибов $d = 25 - 60$ мм (табл. 2).

Таблица 2

Антагонистическая активность местных изолятов *Bt*

Штамм	Диаметр зоны подавления роста грибов d (мм)	
	<i>Verticillium dahliae</i>	<i>Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum</i>
Коллекционные культуры		
7_1	25	23
88	55	25
80	45	45
49	55	50
44-2	45	60
44-1	45	30
47	50	45
17	30	25
6	40	25
74	42	22
71 паст.	55	25
73	55	35
Вр. Зер. 22	20	20
12 ФО	25	20
Новые изоляты		
T-115-2	60	22
T-115-4	20	16
T 115-11	25	12
T 115-25	25	30

Совокупность полученных экспериментальных данных указывает на возможность использования местных изолятов *Bt* в качестве перспективных продуцентов биопрепаратов, сочетающих антифунгальную и энтомоцидную активности. Создание банка изолятов *Bt* с полифункциональными свойствами необходимо для дальнейшего развития производства по выпуску биопрепаратов в Республике Узбекистан.

ВАЛИДАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОПЛАЗМ

Н. С. Куцерубова, М. П. Богрянцева,
С. С. Сайфутдинова, Е. А. Нечаева

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

В соответствии с современными требованиями GMP, все методики, используемые для контроля качества лекарственных препаратов и их компонентов, должны быть провалидированы.

Одним из важных контролей медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), в том числе вакцин, является контроль на отсутствие посторонних агентов, а именно микоплазм.

В настоящее время на рынке отсутствуют зарегистрированные в установленном порядке коммерческие питательные среды для выделения и культивирования микоплазм.

Целью данного валидационного испытания явилось подтверждение пригодности компонентной питательной среды (среда Каган полужидкая) с содержанием 0,3 % агара и 15 % сыворотки эмбриональной телячьей (Gibco), приготовленной в условиях лаборатории биологического контроля ОБТК ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», для выделения и культивирования микоплазм.

Основными действующими нормативными документами, регламентирующими проведение контроля на отсутствие посторонних агентов, являются Государственная Фармакопея РФ (ГФ), методические указания МУК 4.1/4.2.588-96 — "Методы, контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям", общие фармакопейные статьи (ФС) и фармакопейные статьи предприятия (ФСП) на МИБП.

В соответствии с ГФ XII издания, ч. 1 исследование ростовых свойств испытуемой среды заключается в сравнении роста тест — микроорганизмов в емкостях (пробирках, чашках Петри) с испытуемой средой и в емкостях со стандартной питательной средой.

Процедура валидации питательной среды проводилась путем сравнения биологических (ростовых) свойств и стерильности испытуемой и стандартной среды. Для валидации использовали питательную среду для выделения и культивирования микоплазм полужидкую (среда Каган полужидкая), приготовленную из компонентов в лабораторных условиях. В качестве контрольной стандартной среды была использована питательная среда для обнаружения микоплазм (*Mycoplasma Broth Base w/o CV*) с содержанием 0,3 % агара и 15 % сыворотки эмбриональной телячьей (Gibco) импортного производства.

Валидация была проведена на 3 сериях питательной среды для выделения и культивирования микоплазм полужидкой (среда Каган полужидкая) и 3-х серий стандартной импортной среды.

Пригодность методики испытания

1. Использовался стандартный образец тест-штамма *Mycoplasma arginini* G 230 (CO), аттестованный в соответствии с рекомендациями ВОЗ;

2. Подготовка всех испытуемых серий питательной среды проводилась в асептических условиях;

3. Был проведен контроль физико-химических свойств каждой партии испытуемой и стандартной питательной среды;

4. Проведен контроль ростовых свойств каждой партии испытуемой и стандартной питательной среды.

По завершению всех этапов контроля каждое отдельное исследование оформлялось в виде протокола.

Во всех испытуемых и стандартных сериях питательной среды рост тест штамма *Mycoplasma arginini* G 230 (CO) в разведении 10^{-7} был выявлен на 3–4 сутки культивирования, что соответствует заявленным критериям приемлемости по ростовым свойствам.

По характеру микрофлоры в испытуемых и стандартных средах были выявлены мелкие небольшие колонии в виде беловатых полупрозрачных комочков, на 7 сутки после посева в некоторых пробирках происходит распад клеточной стенки *Mycoplasma arginini*.

Питательная среда для выделения и культивирования микоплазм (среда Каган полужидкая) с содержанием 0,3 % агара и 15 % сыворотки эмбриональной телячьей (Gibco) и стандартная питательная среда для обнаружения микоплазм (*Mycoplasma Broth Base w/o CV*)

с таким же содержанием агара и сыворотки, приготовленные в условиях микробиологической лаборатории, соответствовали требованиям МУК 4.1/4.2.588-96 и были использованы при испытании жидкого полуфабриката коревой вакцины, посевного вируса, растворов желатозы, первичных культур клеток, трипсина и др. Приготовленная таким образом питательная среда позволит, при наличии, выявить микоплазмы в компонентах вакцины и в дальнейшем избежать контаминации микоплазмами готового лекарственного препарата.

Вывод: по результатам проведенной валидации, данная методика контроля лекарственных препаратов и их компонентов на отсутствие микоплазм с использованием питательной среды для выделения и культивирования микоплазм, приготовленной в лабораторных условиях, гарантирует получение стабильных, достоверных результатов и считается пригодной.

Список литературы

1. О.В. Гунар, И.А. Буйлова, Л.В. Колосова, А.В. Доренская. Применение валидационных исследований для оценки микробиологических методик//Ведомости научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2013. № 3. С. 4–7.
2. Государственная фармакопея РФ XII издание, часть 1. М: «Издательство «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». 2007. С. 181–193.
3. МУК 4.1/4.2.588-96. «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов вводимых людям», МЗ России, Москва, 1998, С. 41–59.

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ *COTINUS OBOVATUS* RAF. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

В.М. Оксантиук, Л.А. Колдар

Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН Украины

Среди растений, используемых в зеленом строительстве Украины малоизвестными и недостаточно распространенными, являются

представители рода *Cotinus* Mill. семейства *Anacardiaceae* Lindl., которые имеют высокие хозяйственно-ценные, декоративные и лекарственные свойства. Жизненная форма растений рода *Cotinus* — деревья высотой до 12 м или кусты с густой шаровидной кроной и последовательными, простыми, яйцевидными листьями, длиной до 8 см.

Это очень декоративные растения, соцветия которых покрыты белыми или фиолетовыми волосками, в связи с чем образованные метелки имеют вид пышного султана и сохраняют очень красивый вид до конца вегетации. Цветки мелкие, желто-белые или зеленые, длиной 2–3 мм, часто недоразвитые, собранные в рыхлые широко-конусообразные метелковые соцветия длиной 15–30 и шириной 7–12 см.

К данному роду принадлежат два вида *Cotinus coggygia* Scop. и *Cotinus obovatus* Raf., а также их декоративные формы и сорта.

Наиболее распространенным в Украине является вид *C. coggygia*. Это дерево до 4–5 м высотой с шаровидной иногда зонтиковидной кроной или же ветвистый куст с простыми яйцевидными или овальными листьями. К почвам не требователен, хорошо растет на засоленных почвах. *C. coggygia* дико растет на территории Украины в лесах Закарпатской, западной и юго-западных областях, в восточной части по реке Донец, в Крыму — на южных и северных склонах Крымских гор, на Кавказе — предгорьях Северного Кавказа и Закавказья. В культуре распространен как декоративное и лесомелиоративное растение в насаждениях степной и лесостепной зон европейской части бывшего СССР.

Однако малораспространенным в Украине есть интродуцированный вид — *C. obovatus*. Природные ареалы его занимают территорию северной и юго-восточной Америки: штаты Техас, Оклахома, Миссисипи, Арканзас, Алабама, Теннесси. Согласно ботанико-географического районирования А. Л. Тахтаджяна, район распространения *C. obovatus*, относится к провинции Атлантической низменности, которая является частью Атлантическо-Североамериканской области, Бореального подцарства, Голарктического царства.

Сегодня в Украине, в условиях культуры *C. obovatus* культивируется единичными экземплярами только в Криворожском Ботаническом

саду НАНУ и в Ботаническом саду им. акад. А. В. Фомина Киевского национального университета им. Тараса Шевченко.

В Национальный дендропарк «Софиевка» НАН Украины *C. obovatus* попал в виде отсадков из Ботанического сада им. акад. А. В. Фомина, а также выращенный из семян полученных по делектусу из ботанического сада Люблинского Университета Марии Кюри (Польша). Культивируются растения в кв. № 3 на интродукционном участке им. В. В. Митина. Растения данного вида не требовательны к условиям выращивания, а их декоративность в течение всей вегетации делает их перспективными для использования в озеленении.

Основной предпосылкой получения растительного материала для использования в различных отраслях народного хозяйства является разработка методов массового размножения и дорастивания его до определенной кондиции с сохранением хозяйственно-ценных признаков. Однако низкая эффективность размножения растений *C. obovatus* традиционными методами (вегетативно и семенами) ограничивает их распространение. Поэтому одним из условий успешного внедрения *C. obovatus* в озеленение является разработка эффективных методов массового размножения с сохранением ценных признаков.

К альтернативным, современным методам принадлежит размножение растений в культуре *in vitro* — выращивание растительного материала (клеток, тканей, органов и растений) в асептических условиях на искусственных питательных средах. Это один из способов вегетативного размножения растений, в основу которого положена тотипотентность клеток, то есть их свойство под действием рострегулирующих веществ полностью реализовать свой генетический потенциал, который обеспечивает их дифференциацию и развитие до целого организма.

Исследования проводились в лаборатории микроклонального размножения Национального дендрологического парка «Софиевка» НАН Украины. В качестве эксплантов использовали микропагоны с апикальной меристемой длиной 1–1,5 см взятые из побегов 2-летних растений *C. obovatus*. Полученный материал стерилизовали для освобождения от эпифитных микроорганизмов и грибов. Для

подбора оптимальных вариантов стерилизации испытывали водные растворы различных химических реагентов, в том числе 2,5 % гипохлорит натрия (NaClO), 0,1 % дихлорид ртути (HgCl_2) и 1,0 % нитрат серебра (AgNO_3) при различных экспозициях. С целью повышения эффективности стерилизующих реагентов к раствору добавляли эмульгатор «Твин 80». Наиболее эффективной была стерилизация с применением 0,1 % -ного водного раствора дихлорида ртути с экспозицией 1,5 мин.

Питательные среды, материалы, инструменты и посуду готовили согласно общепринятых методик. Культивирование эксплантов *C. obovatus in vitro* проводили в культуральной комнате при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде, освещенности 3000–5000 лк и относительной влажности воздуха 70 %.

Культивирование микропагонов осуществляли на базовой среде Мурасиге и Скуга (МС), с добавлением сахарозы 30 г/л, агар-агара 7 г/л при pH среды — 5,6–5,8.

Как известно, для активации пазушных меристем исходную концентрацию цитокинина в среде повышают в несколько раз до появления аномальных побегов. В наших опытах для активации в эксплантов *C. obovatus* морфогенетических процессов и роста дополнительных побегов, питательные среды модифицировали добавлением 6-бензиламинопурина (6-БАП) в концентрации 1,0–2,5 мг / л и β -индолилмасляной кислоты (β -ИМК) — 0,05–1,0 мг/л. Оценку эффективности действия питательных сред на активизацию роста и развития эксплантов проводили через 20–25 суток после их введения в культуру *in vitro*.

В результате удачного подбора количественного соотношения фитогормонов, в отдельных случаях наблюдали формирование адвентивных почек. Это служило началом прямого морфогенеза, при котором путем активации меристемных тканей начинали формироваться дополнительные побеги. Наиболее эффективной была питательная среда с добавлением 2,0 мг/л 6 БАП без содержания β -ИМК, где коэффициент размножения составил 4–8, что значительно превышало результаты других вариантов. Увеличение концентрации фитогормонов приводило к появлению витрифицированных побегов.

Таким образом, результаты полученных экспериментальных исследований дают основание утверждать, что экспланты *C. obovatus* при экзогенном действии фитогормонов цитокининовой группы имеют высокий морфогенетический потенциал. Среди изученных модификаций питательных сред наиболее эффективной для повышения морфогенного потенциала эксплантов была питательная среда с добавлением 6-БАП 2,0 мг / л, где коэффициент размножения за один пассаж составлял 4–8.

ХРОНОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕЧЕНИЯ ПУТЕМ КОРРЕКЦИИ БИОРИТМОВ БОЛЬНОЙ ТКАНИ

П. И. Бабич, В. Н. Зарубин

ООО «Сибирский инновационный центр»

Исследования проведённые в области магнитотерапии показали, что при лечении различных заболеваний положительная динамика наблюдается в 60 % случаев, отсутствие положительных результатов составляет 30 %, отрицательный эффект достигает 10 %. При этом было установлено, что эффективность магнитотерапии зависит от частоты электромагнитного поля (ЭМП). Обоснованного научного объяснения этой зависимости специалисты найти не смогли. Целью работы является разработка новой биомедицинской технологии, направленной на повышение эффективности и безопасности лечения соматических заболеваний низкочастотным ЭМП.

Для достижения поставленной цели потребовалось решение двух задач: разработать новый способ лечения и аппарат для его реализации. Способ лечения базируется на хронобиологическом подходе: 1) ритмичности биологических процессов; 2) лабильности биоритмов; 3) явлении усвоения внешних ритмов живыми организмами. Свойство ритмичности биологических процессов означает, что все физиологические процессы, протекающие в организме, сопровождаются соответствующими колебательными процессами, т. е. име-

ют свои биоритмы [1]. Поскольку эти процессы взаимосвязаны, то лечение заболеваний возможно путём воздействия на биоритмы организма. При заболевании происходит нарушение физиологических процессов, которое вызывает отклонение биоритмов от нормы — патологический десинхроноз. Таким образом, одна и та же больная и здоровая биоткань имеют разные биоритмы. Лабильность означает, что частоты биоритмов организма не являются постоянными величинами во времени, а изменяются в определённых диапазонах.

Явление «усвоения ритма» было открыто академиком А. А. Ухтомским [2]. Учёный установил способность тканей, органов и организма в целом перестраивать свои ритмы в соответствии с ритмами внешних раздражений. В нашем случае внешним раздражителем является ЭМП. Способ лечения осуществляется путём коррекции отклонений, возникших в биоритмах больной ткани, импульсным магнитным полем частотой биоритмов здоровой ткани. Суть новой хронотехнологии заключается в следующем: если на больную ткань с частотой биоритмов f_1 **подействовать ЭМП большей мощности частотой биоритмов здоровой ткани f_2** , то в больной ткани установятся вынужденные колебания на частоте биоритмов здоровой ткани f_2 . В результате чего произойдёт устранение патологического десинхроноза, которое повлечёт за собой восстановление нарушенных физиологических процессов и выздоровление. Способ коррекции возможен благодаря тому, что биоритмы обладают свойством лабильности.

Для реализации способа лечения был разработан низкочастотный магнитотерапевтический аппарат «ФизиоМаг» — генератор биоритмов здорового организма. Аппарат охватывает лечением все ткани и органы, биоритмы которых попадают в диапазон его рабочих частот. На аппарат получен патент РФ на полезную модель [3]. На способ лечения подана патентная заявка на изобретение.

В настоящее время имеющиеся на рынке магнитотерапевтические аппараты работают на частотах, которые подобраны эмпирическим путём или определены косвенными методами. Такие частоты не могут гарантировать получение только положительного терапевтического эффекта, т.к. они далеко не всегда попадают в соответствующие диапазоны биоритмов тканей и органов здорового организма.

Положительная динамика от их применения в основном достигается за счёт общей или локальной магнитотерапии и опосредованного воздействия на больную ткань или орган. В отдельных случаях такие аппараты решают задачу биоуправляемой хронофизиотерапии — согласования терапевтического воздействия с основными биоритмами организма (пульса и/или дыхания) [4]. Существующая магнитотерапия не лечит, а улучшает состояние больного за счёт магнитной составляющей ЭМП, которая действует при любой частоте. Новое направление — хрономагнитотерапия уже позволяет осуществлять лечение заболеваний частотой биоритмов здоровой ткани и органов.

Высокая эффективность хрономагнитотерапии на аппарате «ФизиоМаг» достигается за счёт отсутствия побочного воздействия на организм и комплексного лечения путём частотной коррекции биоритмов больной ткани с одновременным воздействием на неё методом локальной магнитотерапии. Клинические исследования, проводимые при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта, показали, что в зависимости от вида заболевания, положительная динамика увеличивается на 10–12%, значительно снижается употребление лекарственных препаратов, а сроки лечения сокращаются на 10–15%. Планируется проведение исследований по применению разработанной биомедицинской технологии в лечении опухолевых заболеваний.

Список литературы

1. Загускин С. Л. Ритмы клетки и здоровье человека. Монография // Ростов-на-Дону, ЮФУ, 2010. 292 с.
2. Ухтомский А. А. Усвоение ритма в свете учения о парабioзе. // Избранные труды. Под редакцией Е. М. Крепса. Ленинград: Издательство «Наука», 1978. Серия «Классики науки».
3. Зарубин В. Н., Семин М. М. Магнитоимпульсный низкочастотный терапевтический аппарат // Патент РФ № 120878. Приоритет 10.01.12.
4. Загускин С. Л., Борисов А. А. Биоуправляемая хронофизиотерапия при травмах и гастроэнтерологических заболеваниях // Вестник РАМН, 2000, № 8, с. 49–52.

НОВАЯ LIKE-СИСТЕМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННО ВАЖНЫХ БЕЛКОВ

А. О. Тихонова, А. А. Тойменцева

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии*

Рост населения Земли предполагает увеличение масштабов производства промышленно важных белков — для биотехнологий, биофармацевтики (факторы крови, тромболитики и антикоагулянты, гормоны, ферменты, факторы роста, интерфероны и интерлейкины, вакцины), сельского хозяйства (ферменты животных кормов; средства защиты растений), производства моющих средств, природоохранной деятельности (ферментные системы биodeградации токсичных соединений окружающей среды). Интерес к ферментам микроорганизмов объясняется недостаточной способностью белков животного и растительного происхождения удовлетворять рыночный спрос на жизненные потребности населения планеты. Для производства любого рекомбинантного белка необходима экспрессионная система, обеспечивающая повышенный выход продукции. Выбор системы экспрессии зависит от свойств целевого белка и способности хозяйской клетки продуцировать белок нужного качества при соблюдении минимального набора требований. Таким образом, актуальной задачей является как совершенствование известных, так и создание новых экспрессионных систем.

Как правило, экспрессионная система представляет собой плазмиды (векторы), в составе которых располагаются все необходимые регуляторные элементы (промоторы, соответствующие гены белков-регуляторов) для последующей интеграции под их контроль целевых генов. Такие плазмиды переносят в клетку-продуцент (бактериальные, эукариотические) для производства целевого белка.

На основе промотора P_{liat} *Bacillus subtilis* нами создана новая LIKE-система экспрессии (от нем. **L**ia-**K**ontrollierte **E**xpression), позволяющая направленно изменять экспрессию генов при добавлении стрессо-

вого фактора (индуктора) в питательную среду. В качестве индуктора использован антибиотик бацитрацин. Эксперименты с использованием генов *lacZ* и *gfp* под контролем промотора P_{lial} показали особо высокий уровень экспрессии (до 1000 раз) этих генов при воздействии антибиотика. Причем накопление целевого белка проявляется уже через 10–15 мин, в отличие от аналогов, проявляющих свое действие только через несколько часов! LIKE-система основана на двух типах векторов: pLIKE-int и pLIKE-rep. Первый тип позволяет получать экспрессию интересующего гена в геноме. Второй, pLIKE-rep тип — на плазмиде. LIKE-система содержит оптимизированный промотор P_{lial} , что 6-кратно повышает эффективность трансляции. По сравнению с интегративной экспрессией, репликативная экспрессия даёт повышенный выход белка вследствие мультикопийности вектора.

Использование обнаруженного нами промотора *B. subtilis* и созданной на его основе системы производства рекомбинантных белков различного целевого назначения, является высокоперспективной основой промышленных биотехнологий получения импортозамещающих белковых препаратов.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ГЕННО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ АНТИОНКОРАН-М ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ *

И. В. Алексеенко^{1, 2}, О. А. Безбородова³, Е. Р. Немцова³,
А. Р. Геворков³, Е. В. Хмелевский³, А. С. Соболев⁴,
Р. И. Якубовская³, Е. Д. Свердлов^{1, 2}

¹ ФБУН Институт молекулярной генетики РАН, ² ФБУН Институт
биоорганической химии им. ак. М. М. Шемякина
и Ю. А. Овчинникова РАН, ³ ФГБУ «ФМИЦ им. П. А. Герцена»
Минздрава России, ⁴ ФБУН Институт биологии гена РАН

Разработан новый генно-терапевтический препарат Антионко-
РАН-М, который представляет собой комплекс генной конструкции,

* Исследование поддержано грантом Президента России МК-6185.2015.4
и КОМФИ № 13-04-40170-Н.

содержащей ген-убийцу тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVtk) и ген-иммуномодулятор гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и блок-сополимер ПЭГ (полиэтиленгликоль)-ПЭИ (полиэтиленимин). Для облегчения проникновения в клетки к блок-сополимеру ПЭИ-ПЭГ дополнительно присоединен фрагмент ТАТ-белка, повышающий эффективность проникновения блок-сополимера в клетки.

Тимидинкиназа вируса простого герпеса (HSVtk) — фермент, который способен фосфорилировать низкотоксичный аналог гуанозина — ганцикловир до ганцикловирмонофосфата. Когда в опухолевые клетки доставляется извне ганцикловир, клетки, трансформированные HSVtk, погибают, поскольку HSVtk превращает его в ганцикловирмонофосфат, который затем клеточные киназы фосфорилируют до ганцикловиртрифосфата. Последний при клеточном делении включается во вновь синтезированную цепь ДНК и обрывает ее дальнейший синтез. Таким образом, происходит селективное уничтожение раковых клеток, так как нормальные покоящиеся клетки не синтезируют ДНК и не включают фосфорилированный ганцикловир.

Очень важной особенностью данного подхода является способность вновь образуемого ганцикловиртрифосфата высвобождаться из клетки, в которой он был образован, и проникать в соседние раковые клетки, вызывая их гибель. Образование токсинов внутри раковых клеток и их диффузия в соседние клетки резко снижает токсичность препарата и увеличивает его терапевтический индекс.

Полагают, что совместная экспрессия генов *HSVtk* и *GM-CSF* в клетках опухоли приводит к гибели раковых клеток за счет работы *HSVtk* и высвобождению из них опухолевых антигенов, которые эффективно представляются антиген-представляющими Т-клетками иммунной системы, активированными GM-CSF, обеспечивая активацию специфического противоопухолевого иммунитета.

В ходе доклинических испытаний АнтионкоРАН-М показано, что препарат обладает высокой противоопухолевой активностью: увеличение продолжительности жизни животных 30–86 %, торможение роста опухоли 75–83 %, торможение метастазирования 80–82 % в зависимости от типа опухоли, и низкой токсичностью.

На мышах с привитой опухолью C26 (аденокарцинома кишечника) показано, что эффективность увеличивается при комбинированном использовании АнтионкоРАН-М и лучевой терапии, не приводя к появлению дополнительной токсичности. Увеличение продолжительности жизни животных, получавших только лучевую терапию составило 18 %, только АнтионкоРАН-М — 35 %, сочетанное лечение (АнтионкоРАН-М+лучевая терапия) — 71 %.

ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ МЕТОДОМ ФЕРМЕНТАТИВНОГО УДЛИНЕНИЯ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНОГО ПРАЙМЕРА С ДВОЙНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ *

Е. Е. Башмакова^{1,2}, В. В. Красицкая², Л. А. Франк^{1,2}

¹ ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», ² ФГБУН
Институт биофизики Сибирского отделения
Российской академии наук

Выявление генетических полиморфизмов важно при исследовании генетических основ заболевания, оценки предрасположенности к тем или иным патологиям, индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам и т. д.

В качестве альтернативы существующим методам определения однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) нами разработан метод, включающий в себя ферментативное удлинение аллель-специфичного праймера с последующим анализом продуктов реакции с помощью биолюминесцентных меток на основе цветных вариантов рекомбинантного фотопротеина обелина. Биолюминесцентный сигнал этого белка возникает в момент присоединения ионов кальция и имеет характер короткой вспышки. Благодаря высокому квантовому выходу реакции и низкому уровню шума обе-

* Работа выполнена при поддержке грантов Российского научного фонда (проекты № 14-14-01119 и 14-35-00107).

лин выявляют в аттомолярных количествах, используя современные фотометры различных форматов и конфигураций. Величина сигнала не зависит от наличия субстрата или каких-либо кофакторов и при избытке Ca^{2+} линейно связана с концентрацией мишени. К настоящему времени рекомбинантный обелин и его генно-инженерные варианты с существенно разной биолюминесценцией являются доступными стабильными белками, что позволяет применять их в составе химических конъюгатов с различными биоспецифическими молекулами в качестве высокочувствительных репортеров в иммуно- и гибридизационном анализе [1,2].

На основе мутантных вариантов фотопротеина обелина, существенно различающихся по цвету и кинетике биолюминесцентных сигналов, нами был разработан метод одновременного анализа двух мишеней в одном образце [3]. Метод был успешно использован и апробирован на большом количестве клинических образцов сыворотки при одновременном иммуноанализе 2-х гонадотропных гормонов (ЛГ и ФСГ), а также тотального и иммуноглобулин-связанного пролактина [4,5]. Эти же репортеры использовали для одновременного выявления аллельных вариантов гена при выявлении однонуклеотидных замен. Принцип разработанного нами метода представлен на рисунке. Фрагмент ДНК, содержащий искомые SNP, амплифицировали и полученные ПЦР-продукты без очистки использовали как матрицу для PEXT (primer-extension) реакции. **Реакционная смесь содержит пару праймеров:** комплементарный аллелю дикого типа, помеченный на 5'-конце 6-карбоксифлюоресцеином, и комплементарный мутантному аллелю, помеченный олигоаденилатом (dA)₂₇. В случае полной комплементарности матрицы и аллель-специфичного праймера происходит его удлинение ДНК-полимеразой. В противном случае синтез не происходит. Вместо тимидинтрифосфата реакционные смеси содержат биотинилированное производное дезоксиуридинтрифосфата (Bio-dUTP), благодаря чему синтезированные олигонуклеотиды содержат остаток биотина. Продукты PEXT реакции переносили в лунки планшета, поверхность которых активирована стрептавидином. Иммуобилизованные на поверхности праймеры, удлиненные ДНК полимеразой, выявляли при помощи смеси конъюгатов мутантного обелина H22E;W92F

с политимидилатом (dT)₃₀ и мутантного обелина Y138F с антителами к флуоресцеину. Билюминесцентную реакцию обоих репортеров инициировали добавлением раствора CaCl₂ и регистрировали последовательно на планшетном люминометре с использованием широкополосных светофильтров, отсекающих сигналы соседнего репортера. Генотип определяли по соотношению билюминесцентных сигналов BLзел/BLфиол (дискриминационный фактор, Д). Значения Д для разных генотипов различаются существенно, что позволяет проводить генотипирование с высокой достоверностью.

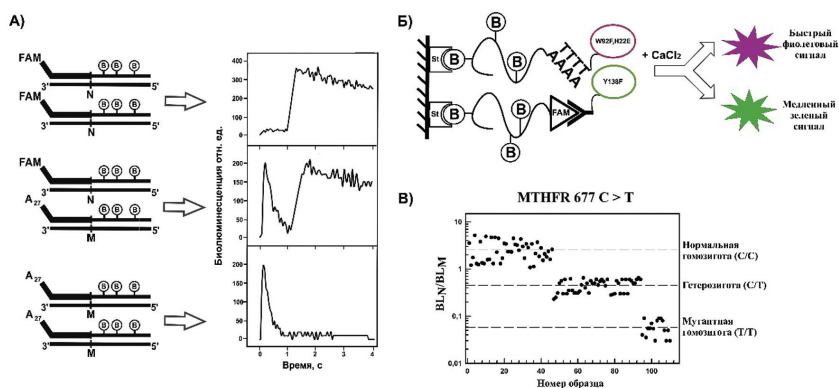


Рис. 1. А — продукты PEXt реакции и результаты билюминесцентного анализа при разных вариантах генотипа; Б — твердофазный билюминесцентный микроанализ продуктов PEXt реакции. St — стрептавидин; В — остаток биотина; W92F,H22E и Y138F — репортерные белки, фиолетовый и зеленый, соответственно. FAM — остаток флуоресцеина; В — результаты генотипирования полиморфизма гена метилтетрагидрофолатредуктазы (MTNFR)

Например, при выявлении мутации Лейден в клинических образцах ДНК одновременно предложенным способом и сертифицированным методом на основе ПЦР-РВ (набор НПО «Литех») не обнаружено ни одного расхождения результатов (N = 84). Кроме того, пока-

зано, что биолюминесцентный способ не уступает методу на основе ПЦР-РВ по параметрам экономической эффективности [6].

Предложенный метод использовали для одновременного определения полиморфизмов 4-х разных генов, ассоциированных с риском развития нарушений системы гемостаза. Три из них: мутация Лейден (FV, rs6025), полиморфизм гена метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR, rs1801133) и мутация гена протромбина (FII, rs1799963) повышают риск развития тромботических явлений и развития тромбофилии. Четвертый полиморфизм — полиморфизм гена фактора свертываемости VII (FVII, rs 6046), как предполагают, имеет защитный эффект относительно риска развития тромбозов. Определение данных полиморфизмов важно в комплексе, поскольку тромбофилия — многофакторное заболевание, являющееся результатом совместного воздействия внешних факторов и генетических вариантов нескольких генов.

При генотипировании клинических образцов ДНК на наличие исследуемых четырех полиморфизмов на первом этапе все матрицы получали одновременно в одной пробирке с помощью мультиплексной амплификации и полученную смесь без очистки использовали для четырех отдельных PEXT реакций. Результаты мультиплексного биолюминесцентного генотипирования полностью совпали с результатами раздельного генотипирования, полученными методом на основе ПЦР-РВ (N = 30).

Еще одним примером использования предложенного метода является генотипирование трех полиморфизмов в гене меланокортинового рецептора первого типа (MC1R), ассоциированных с фенотипом («red-hair mutations») и имеющих связь с риском развития меланомы и немеланомного рака кожи. Нами исследованы созданные модельные плазмиды со вставкой полиморфного фрагмента гена MC1R (нормального варианта и с тремя однонуклеотидными полиморфизмами rs1805007; rs1805008 и rs1805009), а также ряд ДНК из клинических образцов [7]. При генотипировании SNP гена MC1R амплифицированный полиморфный участок ДНК использовали как матрицу для трех отдельных PEXT реакций, определяющих три исследуемых полиморфизма. Все результаты биолюминесцентного анализа подтверждены секвенированием (N = 77).

Таким образом, разработанный нами способ выявления аллельных вариантов гена на основе PEXТ реакции с последующим биолюминесцентным анализом полученных продуктов обеспечивает достоверное генотипирование. Анализ проводится в высокоэффективном планшетном формате и занимает около 2 ч (вместе с наработкой матрицы). Биолюминесцентные метки стабильны при хранении в растворе (не менее 2-х месяцев при 8°C) и в замороженном виде (не менее года), что делает возможным создание аналитических наборов для клинического применения. Возможно дальнейшее развитие метода в направлении автоматизации ряда процедур и увеличения числа анализируемых полиморфизмов.

Список литературы

1. Frank L.A., Ca²⁺-regulated photoproteins: effective immunoassay reporters // *Sensors* — 2010, **10**, 11287–11300.
2. Frank L.A., Krasitskaya V.V., Application of enzyme bioluminescence for medical diagnostics // *Adv Biochem Eng Biotechnol* — 2014, **144**, 175–197.
3. Frank L.A., Borisova V.V., Markova S.V., Malikova N.P., Stepanyuk G.A., Vysotski E.S. Violet and greenish photoprotein obelin mutants for reporter applications in dual-color assay // *Anal Bioanal Chem* — 2008, **391**, 2891–2896.
4. Kudryavtsev A.N., Krasitskaya V.V., Petunin A.I., Burakov A.Y., Frank L.A. Simultaneous bioluminescent immunoassay of serum total and IgG-bound prolactins // *Anal Chem* — 2012, **84**, 3119–3124.
5. Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N., Shimomura O., Frank L.A. Obelin mutants as reporters in bioluminescent dual-analyte binding assay // *Anal Methods* — 2013, **5**, 636–640.
6. Красицкая В.В., Субботина Т.Н., Ольховский И.А., Франк Л.А. Определение мутации Лейдена методом ферментативного удлинения аллель-специфического праймера с двойной биолюминесцентной детекцией (РЕД-Биолюм) // *Клиническая лабораторная диагностика* — 2013, **12**, 26, 39–41.

7. Башмакова Е. Е., Красицкая В. В., Бондарь А. А., Козлова А. В., Т. Г. Рукша, Франк. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (R160W, R151C, D294N) в гене рецептора меланокортина -1 (MC1R) биolumинесцентным анализом // Молекуляр. биология — 2015. **49**, 5 (принята в печать) DOI: 10.7868/S0026898415050031.

РАЗРАБОТКА ПОРТАТИВНОГО МИКРОФЛЮИДНОГО КАРТРИДЖА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗНАЧЕНИЯ МЕЖДУНАРОДНОГО НОРМАЛИЗОВАННОГО ОТНОШЕНИЯ В ОБРАЗЦАХ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ *

С. А. Долгушин¹, Т. А. Середина², Е. С. Одинцова^{2,3}, Н. А. Базаев¹,
П. В. Руденко¹, А. В. Тронин²

¹ ОАО «Зеленоградский инновационно-технологический центр»,

² ЗАО «МБС-Технология», ³ ФГБУН «Институт химической
биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения
Российской академии наук»

В России, по данным Минздрава, среди всех причин смертности заболевания системы кровообращения занимают лидирующие позиции, опережая заболевания органов дыхания, пищеварения и новообразования. За последние 20 лет смертность от заболеваний системы кровообращения составляет около 50 %.

Система свёртывания крови (гемостаза) представляет собой многофакторный механизм, направленный на поддержание оптимальных реологических свойств крови. Условно гемостаз подразделяется на коагуляционный и тромбоцитарно-сосудистый. Оба пути имеют сложно устроенные механизмы реализации и регуляции, любые нарушения в которых являются причиной развития заболеваний. В коагуляционном гемостазе участвуют плазменные факторы свертывания. Этот этап

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.607.21.0066, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0066).

включает активацию плазменных факторов и образование фибрина, скрепляющего тромбоцитарную пробку. Тромбин — основной фермент коагуляционной системы, катализирующий превращение фибриногена в фибрин. Динамикой и количеством образовавшегося тромбина определяются скорость и интенсивность превращения фибриногена в фибрин, а, следовательно, и всего процесса тромбообразования.

Протромбиновое время (ПТВ) и его производные протромбиновый индекс (ПТИ) и международное нормализованное отношение (МНО) — лабораторные показатели, определяемые для оценки внешнего пути свёртывания крови. Значения ПТВ у одних и тех же здоровых пациентов варьируются в разных лабораториях в зависимости от используемого тканевого фактора (тромбопластина). Параметр МНО был введён в клиническую практику с целью стандартизации результатов ПТВ. Производители тканевого фактора для тестов ПТВ обязаны указывать значение международного индекса чувствительности (МИЧ) для каждой произведенной партии реагента, где значение МИЧ (от 1.0 до 2.0) показывает активность тканевого фактора в данной партии в сравнении со стандартизованным образцом. МНО рассчитывается как отношение ПТВ исследуемого образца к ПТВ нормального (контрольного) образца, возведённое в степень МИЧ использованного при тесте реагента ($\text{МНО} = (\text{ПТВ}_{\text{test}} / \text{ПТВ}_{\text{normal}})^{\text{МИЧ}}$).

Полученные значения ПТВ или МНО позволяют осуществлять эффективную терапию варфарином и тем самым снижать риск тромбообразования. Быстрое и точное измерение показателей ПТВ или МНО важно для проведения безопасной и эффективной антикоагуляционной терапии. В последнее время достаточно широкое распространения получили компактные приборы (коагулометры), позволяющие мониторировать МНО пациентам самостоятельно в домашних условиях. К таким приборам, использующим метод импедансной коагулометрии, относятся INRatio (Alere, США) или CoaguCheck (Roche, Швейцария). Для проведения анализа используются либо пластиковые картриджи (Alere), либо одноразовые тест-полоски (Roche). В настоящее время российских аналогов подобных приборов не существует, при этом стоимость расходных материалов для зарубежных приборов достаточно высока.

Принцип работы данного типа коагулометров основан на измерении значения импеданса исследуемого образца в контрольной и тестовой ячейках. Для анализа используется цельная капиллярная кровь пациента. При активации свёртывания за счёт тканевого фактора, на электродах в области реакции оседают слои фибриновых сгустков, вследствие чего происходит повышение импеданса образца. По мере изменения импеданса можно дать оценку динамики образования фибринового сгустка.

В работе представлены результаты разработки портативного микрофлюидного картриджа для определения значения МНО в образцах цельной капиллярной крови. Картридж представляет собой пластиковый чип с микрофлюидной системой каналов, соединяющих четыре ячейки (ячейка для внесения образца, тестовая и две контрольные). Данный картридж предназначен для использования в разрабатываемом отечественном компактном коагулометре.

Первый слой картриджа (подложка) представляет собой фольгированный полиимид (толщиной около 100 мкм) у которого стравлены участки фольги таким образом, чтобы получился рисунок электрических контактов. Второй и третий слой картриджа изготавливался из одного листа многослойной пленки на которой вырезался рисунок микрофлюидных каналов, ячейки для определения МНО, ячейки для внесения образца и двух контрольных ячеек.

На поверхность покровной пленки в зону микрофлюидного канала, прилегающему к ячейке для определения МНО наносился точечно рабочий раствор тканевого фактора, состоящий из тканевого фактора (НПО «Ренам»), глюконата кальция и хлорида натрия. Подготовленный лист покровной пленки наклеивали на первый слой (подложку) картриджа таким образом, чтобы электрические контакты находились точно в пределах ячейки для определения МНО и контрольных ячеек. Затем полученную заготовку нарезали на индивидуальные картриджи размером 8.0 на 2.2 см.

Изготовленные картриджи будут использованы для экспресс-измерения образцов цельной капиллярной крови при помощи разрабатываемого отечественного компактного коагулометра.

КОНСТРУИРОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ АССОЦИАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА МЕТОДОМ «СЛОЙ-ЗА-СЛОЕМ»*

В. В. Ершкова^{1,2}

¹Новосибирский государственный университет, ²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Благодаря своим уникальным свойствам наночастицы благородных металлов (например, золото, серебро) широко применяют как объект фундаментальных исследований, так и в прикладных разработках. Наночастицы золота (НЧЗ) обладают хорошей способностью проникновения в клетки, уникальными физическими и химическими свойствами, а также низкой токсичностью.

Перспективными объектами конъюгации с наночастицами золота являются различные низкомолекулярные биологически активные соединения (гормоны, лекарства, антибиотики и т. д.), высокомолекулярные биополимеры: белки, НК (нуклеотиды, олигонуклеотиды, ДНК, РНК). Однако до сих пор остались нерешёнными проблемы создания стабильных нековалентных и «многослойных» ассоциатов на основе наночастиц золота. Остаются вопросы по получению неагрегированных НЧЗ и их биосовместимых конъюгатов. «Слой-за-слоем» — это простой, эффективный способ модификации поверхностей и получения нековалентных наноструктурированных полимерных многослойных тонких пленок и нанокомпозитов с учетом толщины, структуры, свойств и функций с любым типом субстрата.

Целью работы является конструирование и изучение свойств нековалентных ассоциатов наночастиц золота с олигонуклеотидом (ОН) и полиэтиленгликолем (PEG), а именно Au/PEG/ОН/PEG методом «слой-за-слоем».

Были синтезированы широко-используемые НЧЗ размером 14 ± 2 нм, используя в качестве восстановителя золотохлористоводородной кислоты цитрат натрия. Частицы характеризовали методом

* Научный руководитель — канд. хим. наук И. А. Пышная.

спектрофотометрического анализа (рис. 1, *а*), а размерные данные (диаметр) определяли методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рис. 1, *б*) и фотонно-корреляционной спектроскопии (ФКС). Таким образом, были получены НЧЗ размером 14 нм и с поверхностным зарядом -30 мВ.

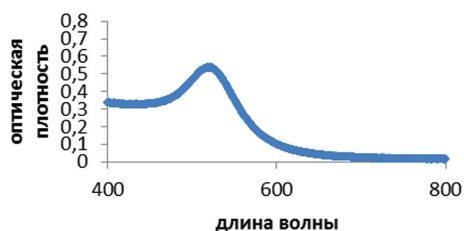
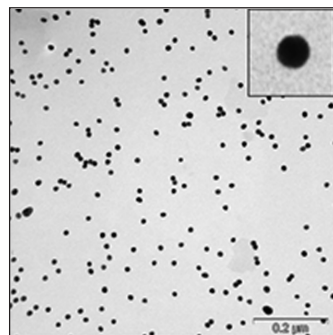
*а**б*

Рис. 1. Спектрофотометрический спектр наночастиц золота (*а*), ПЭМ-изображения НЧЗ (*б*)

Для стабилизации и усиления связывания наночастиц с первым слоем на основе PEI модифицировали НЧЗ меркаптоундекановой кислотой (MUA), так как благодаря своим гидрофобным «хвостам» она способна образовывать монослой, присоединяясь к поверхности наночастиц золота. Далее методом «слой-за-слоем» присоединяли разветвленный или линейный PEI, меченный флуоресцеином. Наночастицы золота, модифицированные MUA, имели отрицательный поверхностный заряд, а введение PEI приводило к его смене на положительный ($+50$ мВ). Размер данного ассоциата, согласно ПЭМ, является суперпозицией размера исходной НЧЗ (14 ± 2 нм) и PEI-«коронны» — плотного однородного слоя, размер которого составил 10 нм. Количество присоединившегося полиэтиленimina оценивали по интенсивности флуоресценции в супернатанте после отмывочных процедур.

Далее присоединяли олигонуклеотид A_{26} через электростатические взаимодействия. Заряд ассоциатов Au/PEI/ON менялся на отрицатель-

ный (-11 мВ), а согласно ПЭМ изображениям происходило уплотнение внешнего слоя. Количественный расчет сорбированного олигонуклеотида проводили с помощью введения радиоактивно меченого олигонуклеотида. Считали радиоактивность по Черенкову в пробе супернатанта от промывочных процедур после присоединения олигонуклеотида.

Аналогично первому слою на заключительном этапе создания ассоциатов присоединяли дополнительный слой полиэтиленimina. В результате получали положительно заряженные наночастицы, обладающие 14 нанометровой «коронай».

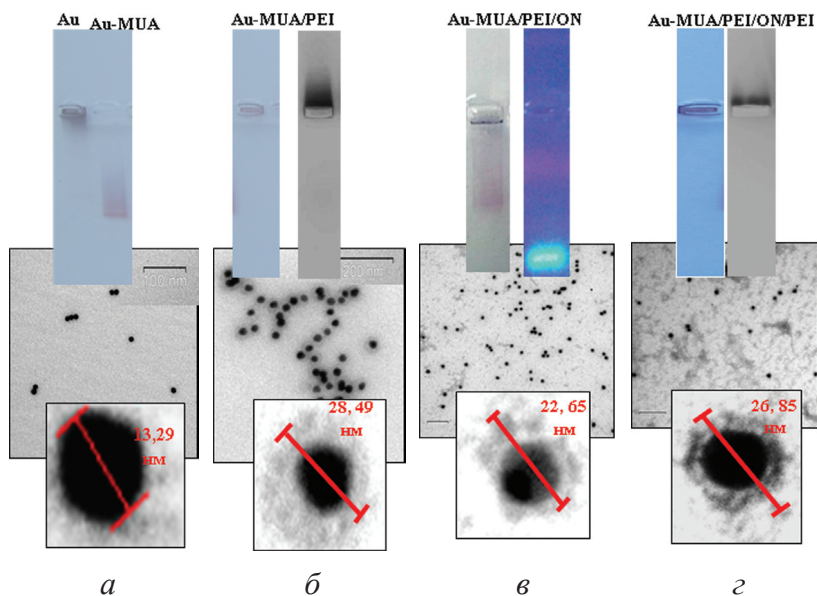


Рис. 2. Сканированные и флуоресцентные изображения 1 % агарозного геля электрофоретического анализа: Au, Au-MUA (А), Au-MUA/PEI (Б), Au-MUA/PEI/ON (В), Au-MUA/PEI/ON/PEI (Г). Внизу представлены ПЭМ изображения общего вида золь наночастиц и увеличенный вид одной частицы в каждом золе

Из полученных данных можно сделать вывод, что при присоединении MUA размер частиц почти не меняется, а при присоединении PEI он значительно возрастает, при этом образуется четкий слой од-

народной плотности. При конъюгации с олигонуклеотидом происходит уплотнение внешнего слоя на поверхности наночастиц, вероятно олигонуклеотид сорбируется не монослоем, а несколько разрыхляет предыдущий слой. На конечном этапе при присоединении полиэтиленимина мы видим увеличение «короны», а также на изображениях ПЭМ видны чёткие границы сорбированных слоёв (рис. 2, а-г)

На каждом этапе синтеза полученные ассоциаты были характеризованы ФКС относительно размера и поверхностного заряда.

Кроме этого, аналогичные эксперименты по конструированию ассоциатов Au/PEI/ON/PEI повторили для наностержневой золота.

Таким образом, охарактеризованы все стадии создания положительно заряженных ассоциатов наночастиц, что важно для проникновения их через клеточную мембрану. Получены как сферические, так и стержневые наночастицы золота, несущие полиэтиленимин и олигонуклеотид.

ШТАММ *PANTOEA VAGANS* 3.2 — ПРОДУЦЕНТ СИДЕРОФОР КАТЕХОЛОВОГО РЯДА

Д. Л. Илюхина¹, А. Д. Сулейманова²

*Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»
(ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный универси-
тет») Институт Фундаментальной Медицины и Биологии,
Россия, Казань*

Заражение кормов, продуктов питания и сельскохозяйственных культур растений фитопатогенными грибами вызывает необходимость постоянного санитарно-микробиологического контроля почвы, и приводит к экономическому ущербу народное хозяйство. Борьба с микозами растений является одним из приоритетных направлений развития сельского хозяйства. В связи с этим, актуальной задачей является поиск новых штаммов способных подавлять рост патогенных микроорганизмов.

Из почв лесного массива Республики Татарстан выделен и идентифицирован штамм *Pantoea vagans* ВКПМ: В11689 (3.2). Известно, что *P. vagans* является одной из эффективнейших бактерий в борьбе с заболеваниями растений, вызванными фитопатогенными микроорганизмами. В связи с этим, целью данной работы явилось изучение антимикробных свойств *P. vagans* 3.2.

Продукцию сидерофор определяли на дифференциальной среде с хром азуролом S (CAS среда) [1]. В двух повторностях по 5 мкл суспензии промытых клеток на бедной питательной среде М9. Плотность клеток опытного и контрольного штамма одинакова и составила $OD_{590}=0,1$

Формирование минимальной зоны просветления (0,7 см) на CAS-агаре штаммом *P. vagans* 3.2 происходило через 16 часов инкубации при 37°C. Максимальная зона просветления (2,0 см) наблюдалась на третьи сутки инкубации. В качестве контроля был использован штамм *Salmonella typhimurium*.

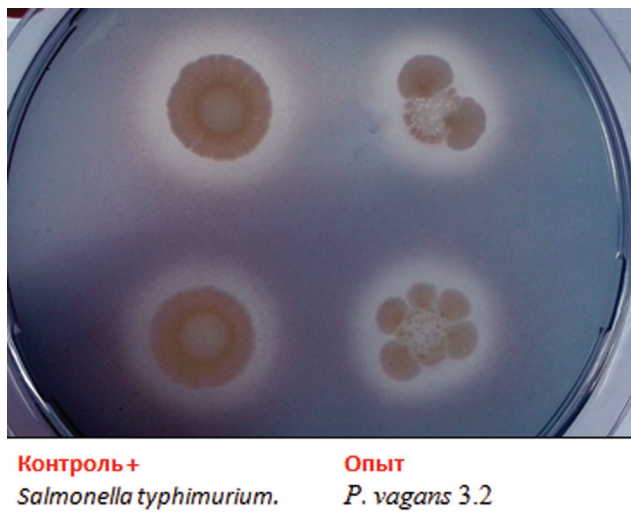
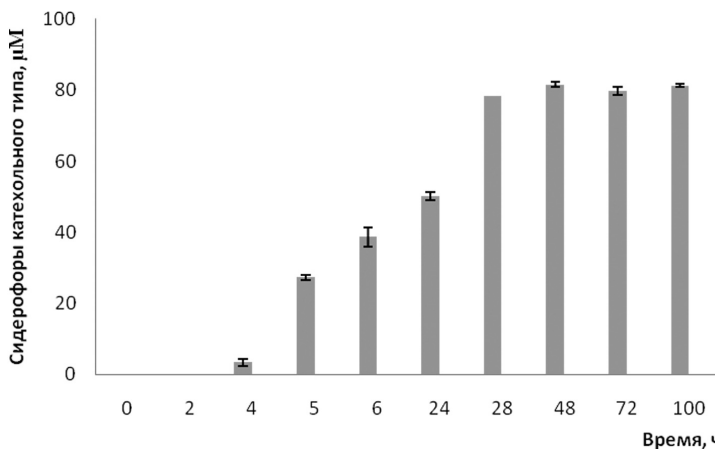


Рис. 1. Выявление зон просветления на дифференциальной CAS среде

Метод Арноу использовали для детекции сидерофор катехолового типа на жидкой среде М9 с внесением бипиридила [2]. Среду М9, содержащую $5 \mu\text{M FeSO}_4$, использовали в качестве контроля.

Сидерофоры катехолового типа в концентрации 26,78 μM были за-
детектированы после 4ч выращивания штамма *P. vagans* 3.2 на жид-
кой среде М9. Максимальная продукция сидерофор (82,05 μM) при-
ходилаась на 28 ч культивирования.



Штамм *P. vagans* 3.2 продуцирует сидерофоры катехолового типа, которые способны эффективно связывать железо. Сидерофоры являются поставщиками железа для бактериальных клеток. Также сидерофоры, продуцируемые почвенными бактериями-симбионтами растений, способны поступать в растительные клетки, обеспечивая их железом. Связывание железа сидерофорами приводит к железодефициту у фитопатогенных микроорганизмов и их конкурентному исключению из ризопланы. Это может служить основой для создания инновационных микробных агrobiотехнологий для решения проблем, связанных с заболеваниями растений, вызванных фитопатогенными микроорганизмами и недостатком железа.

Список литературы

1. B. Schwyn and J.B. Neilands, Anal. Biochem (1987). *Methods in enzymology*. Vol. 235
2. L.E. Arnow, J. Biol. Chem. (1937). *Methods in enzymology*. Vol. 235

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ — ТЕХНОЛОГИЯ КАРТИРОВАНИЯ САЙТОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ *DE NOVO* В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА *

В. В. Кузнецов ¹, М. А. Абдурашитов ^{1, 2},
В. Н. Томилов ², С. Х. Дегтярев ^{1, 2}

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», ² ООО «СибЭнзайм»

Метилирование ДНК у млекопитающих играет важную роль в процессах регуляции экспрессии генов, геномного импринтинга, инактивации X-хромосомы и поддержания целостности генома [1]. Развитие технологий полногеномного секвенирования (NGS) позволило получать генетический портрет организма, неизменный в течение жизни. Профиль метилирования, напротив, отличается у разных типов клеток, а также меняется в зависимости от стадии клеточного цикла и воздействия окружающей среды. Таким образом, эпигенетическое картирование метилированной ДНК в геноме позволяет охарактеризовать функциональное состояние клетки и организма в целом, что является крайне актуальным для современной персонализированной медицины.

Современные полногеномные методы изучения метилома используют 3 способа предварительной обработки ДНК [2]: 1) бисульфитная конверсия; 2) аффинное обогащение (путем связывания метилированных фрагментов ДНК специфическими белками); 3) расщепление метил-чувствительными или метил-зависимыми эндонуклеазами. Бисульфитная конверсия позволяет получить достаточно полную картину расположения 5-метилцитозина в геноме, однако ей сопутствует

* Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Соглашению № 14.576.21.0072 от 06.11.2014 г. (уникальный идентификатор RFMEFI57614X0072), заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

значительная деградация ДНК при обработке бисульфитом натрия, трудность достижения полной конверсии, необходимость секвенирования огромного числа фрагментов и большие затраты времени и средств. Афинное обогащение отличается небольшой трудоемкостью и стоимостью анализа, но в результате получается недостаточно четкая картина метилирования генома. Предварительный гидролиз ДНК C5-метил-зависимыми ферментами рестрикции обогащает библиотеки фрагментами промоторов и генов, хотя его применимость ограничена небогатым выбором сайтов узнавания ферментов.

В настоящей работе для создания эпигенетической карты геномов клеточных линий L-68 (фибробласты легкого), Raji (лимфома Беркитта) и U-937 (гистиоцитарная лимфома) была использована метил-зависимая эндонуклеаза *GlaI* чей сайт R(5mC)GY является продуктом метилирования *de novo* метилтрансферазами *Dnmt3a* и *Dnmt3b* [3]. Таким образом, при использовании *GlaI* изучаемая ДНК обогащается фрагментами, участвующими в регуляции экспрессии генов.

Эпигенетическое секвенирование проходит в несколько этапов:

- 1) Расщепление геномной ДНК эндонуклеазой *GlaI*;
- 2) Отделение фракции фрагментов 140–400 п.н.
- 3) Парноконцевое секвенирование фрагментов на Illumina GA-IIx.
- 4) Фильтрация и анализ данных.

При выборе диапазона длин *GlaI*-фрагментов для секвенирования учитывалось то, что геном содержит огромное число повторов, которые не слишком значимы для запланированного анализа (на интересуют, прежде всего, гены и их регуляторные участки), но обычно сильно метилированы и могут образовывать основную долю выщепляемых при порезке фрагментов. С помощью разработанного нами программного обеспечения **GenomeDivider** были подсчитаны количества возможных *GlaI*-фрагментов для всего генома и для выборок основных групп повторов (*Alu*, *LINE* и *satellite*, см. рис. 1).

Серым цветом отмечена зона фрагментов длиной <140 п.н. В этой области расположено большое число пиков, образуемых фрагментами из повторов (главным образом, *Alu*), таким образом, использовать эту фракцию нерационально. Поэтому для секвенирования была выбрана фракция фрагментов с длинами 140–400 п.н. (желтый цвет),

которая должна содержать значительно меньшее число последовательностей из повторов.

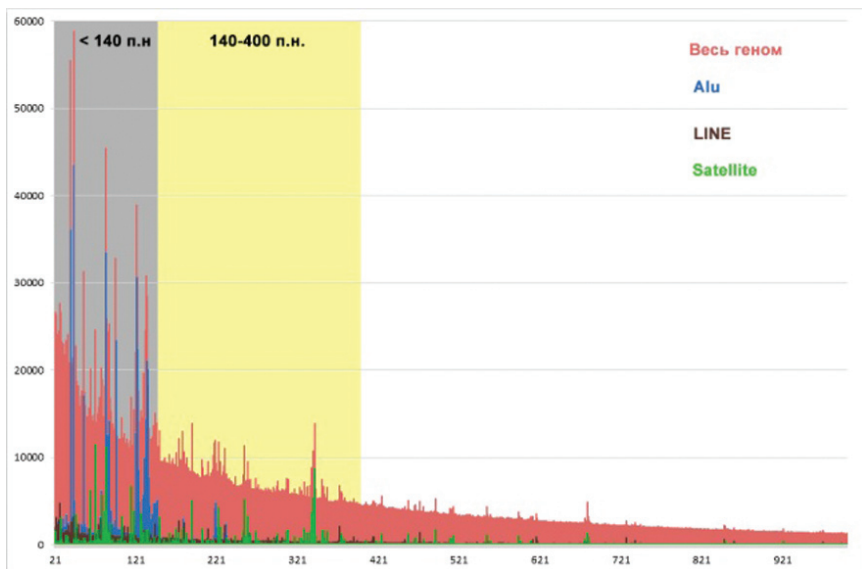


Рис. 1. Результаты анализа гидролиза полностью метилированного генома человека эндонуклеазой Glaf по длинам в программе GenomeDiver. По оси абсцисс — длины возможных Glaf-фрагментов, по оси ординат — длина таких фрагментов

Для составления эпигенетической карты необходимо определить позиции расщепления ДНК ферментом Glaf, указывающие на метилирование этих сайтов, поэтому на следующем этапе работы мы составили выборку позиций, которые соответствуют началам и концам уложенных парноконцевых ридов. Для сокращения полученной выборки убирались те позиции, покрытие которых было меньше 7 для всех трех геномов. В итоге получили базу данных позиций расщепления Glaf, содержащую 1 696 422 сайта расщепления. В результате мапирования сайтов на референсный геном человека, было показано насыщение анализируемой фракции фрагментами генов: 2/3 метилированных позиций лежит в телах генов, но около половины при этом — в интронных повторах (рис. 2.)

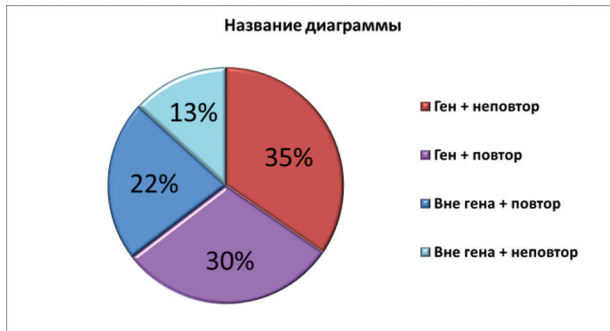


Рис. 2. Диаграмма распределения точек гидролиза GluI относительно расположения генов

Следующий этап анализа заключался в том, чтобы оценить какие предположительные условно-регуляторные участки генов (± 500 п.н. от старта транскрипции) сильнее всего метилированы в трех различных клеточных линиях. Для этого провели суммирование расщеплений для каждого участка для каждой клеточной линии. Это позволило определить те гены, которые являются общими для трех геномов, для каждой пары геномов или являются специфическими лишь для одного генома. На рисунке 3 изображена диаграмма Венна, отражающая число общих элементов для 3-х множеств (сайт <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>), построенная по полученным данным.

Таким образом, из проанализированных 22083 регуляторных участков были составлены списки генов, которые: 1) метилированы в малигнанных клетках, но не метилированы в нормальной клеточной линии (условные маркеры для рака); 2) метилированы лишь в одной из малигнанных линий (типа специфические для определенного вида рака); 3) метилированные лишь в L-68 (маркеры деметилирования при раке). В списках 1–2 находится значительное число генов, описанных в литературе в качестве потенциальных онкомаркеров, например SFRP1, EGFR, TWIST1, DAPK1.

Проделанная работа демонстрирует возможности использования метода эпигенетического картирования геномов по сайтам RCGY с целью поиска маркеров онкопатологий. Получаемые с помощью

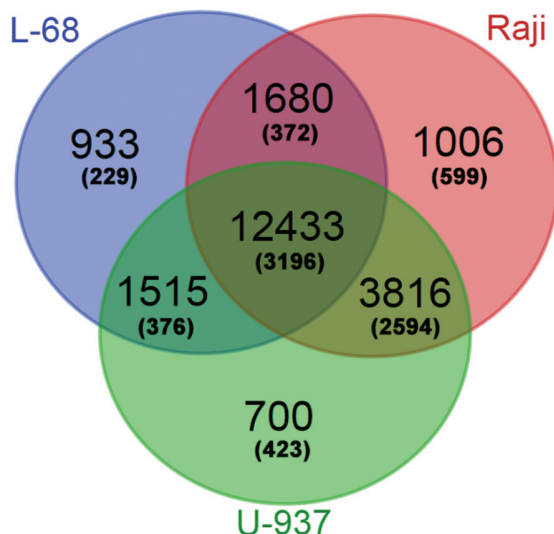


Рис. 3. Диаграмма Венна для метилированных регуляторных участков генов в геномах L-68, Raji и U-937. В скобках указано количество генов с известной функцией

метода данные могут быть использованы для дополнения данных сходных методов HpaII/MspI-, SmaI/XmaI-, MspJI — секвенирования, а также для данных RRBS-секвенирования, поскольку в большинстве случаев, данные не пересекаются. Метод отличается простотой и при дальнейшем удешевлении NGS **может быть применен для масштабного эпигенетического анализа геномов.**

Список литературы

1. Moore L, Le T, Fan G DNA Methylation and Its Basic Function // Neuropsychopharmacology REVIEWS. 2013. V. 38. P. 23–38.
2. Sarda S, Hannenhalli S Next-Generation Sequencing and Epigenomics Research: A Hammer in Search of Nails // Genomics Inform. 2014 Mar. V. 12. №1: P. 2–11.
3. Handa V., Jeltsch A. Profound flanking sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // J.Mol.Biol. 2005. V. 348. № 5. P. 1103–1112.

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА НОВОЙ MD-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ИЗ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЭПИГЕНЕТИКЕ И ОНКОДИАГНОСТИКЕ *

Е. Н. Ломаковская, С. Х. Дегтярёв, Д. А. Гончар, А. Г. Акишев,
Т. Н. Наякшина, О. И. Шляхова, А. Н. Кукова, Н. А. Хлопова,
М. А. Сорокина, С. Г. Удальева, В. А. Чернухин

Сайт-специфические метилзависимые ДНК-эндонуклеазы (MD-эндонуклеазы) — относительно новый и слабо изученный класс ферментов, узнающих и расщепляющих только метилированную ДНК и не расщепляющих неметилированную ДНК.

Проведены биоинформационные исследования, в результате которых выявлены предполагаемые рамки трансляции MD-эндонуклеаз в геномах энтеробактерий. Высокая консервативность первичной структуры ДНК данных рамок трансляции в разных родах энтеробактерий (*Escherichia*, *Klebsiella* и *Cronobacter*) позволила создать праймеры (рис. 1) для проведения поиска новых MD-эндонуклеаз с помощью ПЦР (ПЦР-скрининга), который был осуществлён на ДНК энтеробактерий.

Энтеробактерии для проведения ПЦР-скрининга были выделены из природных источников и отобраны на селективной среде Эндо.

Из геномной ДНК одного из диких штаммов *E. coli* был амплифицирован фрагмент ДНК длиной около 440 п.н. и встроен в вектор pMTL22 (полученная плаزمида получила название pElmI).

* Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Соглашению № 14.576.21.0075 от 06.11.2014 г. (уникальный идентификатор RFMEFI57614X0075), заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

Результаты множественного выравнивания амплифицированного фрагмента и наиболее высокоомологичных нуклеотидных последовательностей приведены на рисунке 1 (множественное выравнивание выполнено в программе VectorNTI 7.1 (<http://www.lifetechnologies.com/ru/ru/home.html>)).

```

elml      (1) ATGAGTGCACGTGAAGCATATCGGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
enterobact1 (1) ATGAGTGCACGTGAAGCATATCGGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
enterobact2 (1) ATGAGTGCACGTGAAGCATATCGGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
enterobact3 (1) ATGAGTGCACGTGAAGCATATCGGCAGTATCGAGAAGCGGTGACTGCTTGCAAAG
enterobact4 (1) ----GTGCACGTGAAGCATATCGGCAGTATCGAGAAGCGGTGCTGCTTGCAAAG

elml      (56) ACATTTTT-GCCCCAGGTGGTCAATGTCACCTGGTGATTACGGTGAACATCTCGTAA
enterobact1 (56) ACATTTTT-GCCCCAGGTGGTAATGTCACCTGGTGATTACGGTGAACATCTCGTAA
enterobact2 (56) GCATTTTT-GCCCCAGGTGGTAATGTCACCTGGTGATTATGGTGAACATCTCGTAA
enterobact3 (56) GCATTTTT-GCCCCAGGTGGTAATGTCACCTGGTGATTATGGTGAACATCTCGTAA
enterobact4 (52) GCATTTTTGCCCCAGGTGGTAATGTCACCTGGTGATTATGGTGAACATCTCGTAA

elml      (110) AGCAACTTTATGTTGGTGAATTATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAG
enterobact1 (110) AGCAACTTTATGTTGGTGAATTATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAG
enterobact2 (110) AGCAACTTTATGTCGGTGAATTATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAG
enterobact3 (110) AGCAACTTTATGTCGGTGAATTATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAG
enterobact4 (107) AGCAACTTTATGTCGGTGAATTATTGCCAAACTCCCATAAAAGCGCCGATGTAG

elml      (165) ATTAGACGATGGCAGCTGTTGCAGGTCAAACACAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
enterobact1 (165) ATTAGACGATGGCAGCTGTTGCAGGTCAAACACAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
enterobact2 (165) ATTAGGCGATGGCAGCTATTGCAGGTCAAACACAGAGTCAATAAAACCCAGTTA
enterobact3 (165) ATTAGGCGATGGCAGCTATTGCAGGTCAAACACAGAGTCAATAAAACCCAGTTG
enterobact4 (162) ATTAGGCGATGGCAGCTGTTGCAGGTCAAACACAGAGTCAATAAAACCCAGTTA

elml      (220) GCGGAATTCGCTCCTGGGATTTTCGATTACCTGATCGGTATTAGCTTAATGACG
enterobact1 (220) GCGGAATTCGCTCCTGGGATTTTCGATTACCTGATCGGTATTAGCTTAATGACG
enterobact2 (220) GCGGAATTCGCTCCTGGGATTTTCGATTACCTGATCGGTATTAGCTTAATGACG
enterobact3 (220) GCGGAATTCGCTCCTGGGATTTTCGATTACCTGATCGGTATTAGCTTAATGACG
enterobact4 (217) GCGGAATTCGCTCCTGGGATTTTCGATTACCTGATCGGCATTAGCTTAATGACG
consensus (221) GCGGAATTCGCTCCTGGGATTTTCGATTACCTGATCGGTATTAGCTTAATGACG

elml      (275) ATGCCGAAGTCATGTTGGCAGTTCGTGTCCTGTAGATGTTTGTGCGCAAATTGC
enterobact1 (275) ATGCCGAAGTCATGTTGGCAGTTCGTGTCCTGTAGATGTTTGTGCGCAAATTGC
enterobact2 (275) ATGCCGAAGTCATGTTGGCAGTTCGTGTCCTGTAGATGTTTGTGCGCAAATTGC
enterobact3 (275) ATGCCGAAGTCATGTTGGCAGTTCGTGTCCTGTAGATGTTTGTGCGCAAATTGC
enterobact4 (272) ATGCCGAAGTAGTATGGCAGTTCGTGTCCTGTGGTATTTGTGCGCAAATTGC

```

```

elml      (330) CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTTGTGATCCATCTTAATGGCGTGCTTCTT
enterobact1 (330) CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTTGTGATCCATCTTAATGGCGTGCTTCTT
enterobact2 (330) CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTTGTGATCCATCTTAATGGCGTGCTTCTT
enterobact3 (330) CGGATATGCCAGCCATGATAACAAATTTGTGATCCATCTTAATAGCGTGCTTCTT
enterobact4 (327) CGGATATGCCAGCCACGATAACAAATTTGTGATTCATCTCAATGGCGTGCTTCTT

elml      (385) AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCACTGAAGAGTTTCAGTCAGTGTAATCCCTAA
enterobact1 (385) AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCACTGAAGAGTTTCAGTCAGTGTAATCCCTAA
enterobact2 (385) AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCACTGAAGAGTTTCAGTCAGTGTA-----
enterobact3 (385) AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCACTGAAGAGTTTCAGTCAGTGTA-----
enterobact4 (382) AAAACGCCTGGCGTAGAAAACGTCACTGAAGAGTTTC-GTCAATGTAATCCTTAA

```

Рис. 1. Выравнивание нуклеотидной последовательности предполагаемого гена, кодирующего Elml, с ближайшими наиболее гомологичными последовательностями ДНК

Обозначения

Обозначения последовательностей:

elml — последовательность амплифицированного фрагмента из дикого штамма *Escherichia coli*.

enterobact1 — последовательность гена, кодирующего гипотетический белок в штаммах *Escherichia coli* BL21(DE3) (идентификатор в Genbank CP010585.1), а также идентичная её последовательность в штамме *Escherichia coli* C41(DE3) (идентификатор в Genbank CP010585.1).

enterobact2 — последовательность гена, кодирующего гипотетический белок в штамме *Klebsiella pneumoniae* (идентификатор в Genbank WP_032444776.1).

enterobact3 — последовательность гена, кодирующего гипотетический белок в штамме *Escherichia coli* (идентификатор в Genbank WP_024239143.1).

enterobact4 — последовательность гена, кодирующего гипотетический белок в штамме *Cronobacter malonaticus* 681 (идентификатор в Genbank CCJ93299.1).

В рамочке, в последовательности гена, кодирующего *ElmI*, выделен единственный нуклеотид, по которому ген отличается от ближайших гомологов из штаммов *Escherichia coli* BL21(DE3) и C41(DE3).

Рамочками с 5'- и с 3'-концов выделены последовательности, соответствующие праймерам, с помощью которых был проведён ПЦР-скрининг на геномных ДНК колиформных бактерий, выделенных из природных источников.

Как видно из данного рисунка, последовательность отличается всего на один нуклеотид от ближайших гомологов из штаммов *Escherichia coli* BL21(DE3), C41(DE3).

Таким образом, клонированный фрагмент ДНК, выявленный в результате ПЦР-скрининга, и представленный предполагаемым геном метилзависимой ДНК-эндонуклеазы *ElmI*, оказывается высокоомологичным участкам геномных ДНК из хорошо известных штаммов *Escherichia coli*.

Все приведённые последовательности начинаются с предполагаемого стартового кодона ATG из заканчиваются предполагаемым стоп-кодом ТАА и могут предположительно рассматриваться как рамки трансляции. Предполагаемая аминокислотная последовательность *ElmI* отличается от ближайших гомологов из штаммов *Escherichia coli* BL21(DE3) и C41(DE3) на одну аминокислоту в позиции 26: остаток серина в *ElmI* находится в этой позиции вместо аспарагина в полипептидах из BL21(DE3) и C41(DE3).

В результате трансформации плазмидой *pElmI* штамма *E. coli* ER2267 был получен рекомбинантный штамм-продуцент. В лизате полученного штамма тестировалась эндонуклеазная активность на плазмиде *pFsp4HI3*, в которой во всех последовательностях 5'-GCNGC-3' метилазой *Fsp4HI* метилирован первый цитозин в положении C5 [1].

Из биомассы данного штамма хроматографическими методами был получен препарат фермента, названного согласно общепринятой номенклатуре *ElmI*. Оказалось, что данный фермент специфично расщепляет метилированную последовательность ДНК 5'-GCNGC-3' при условии наличия в ней не менее трёх 5-метилцитозинов, то есть является MD-эндонуклеазой. Сайт

узнавания данного фермента сходен с таковым для другой MD-эндонуклеазы — PkrI [1], однако в отличие от последней расщепляет метилированную последовательность 5'-GCNGC-3' не после, а перед центральным нуклеотидом N.

Таким образом, впервые с помощью ПЦР-скрининга (а именно на ДНК энтеробактерий) был клонирован ген сайт-специфической метилзависимой ДНК-эндонуклеазы, узнающей и расщепляющей C5-метилированную последовательность. Данный подход в поиске и клонировании новых MD-эндонуклеаз может быть использован и для других селективно отобранных таксономических групп бактерий.

Полученный фермент может быть использован в эпигенетических исследованиях и медицинской онкодиагностике.

Список литературы

1. Чернухин В. А., Наякшина Т. Н., Гончар Д. А., Томилова Ю. Э., Тарасова М. В., Дедков В. С., Михненко Н. А., Дегтярёв С. Х. Новая сайт-специфическая метилзависимая ДНК эндонуклеаза PkrI узнаёт и расщепляет метилированную последовательность 5'-GCN[^]GC-3'/3'-CG[^]NCG-5', содержащую не менее 3-х 5-метилцитозинов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова, Т. 7, № 3, с. 35–42 (2011).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ХОЛАНГИОКАРЦИНОМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ОПИСТОРХОЗОМ

Г. А. Максимова¹, А. В. Ковнер^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», ² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины»

Введение: В настоящее время актуальной проблемой трансляционной медицины остается обоснованность выбора экспериментальной модели заболеваний. Холангиокарцинома, или рак желчных протоков, занимает второе место по встречаемости среди злокачественных заболеваний печени и является агрессивным видом, — быстро прогрессирующим и трудно поддающимся лечению. Как правило, холангиокарцинома выявляется только на поздних стадиях заболевания и большинство пациентов с этим диагнозом живет не более 5 лет. Известно, что существует тесная ассоциация между раком желчных протоков и глистной инвазией печени, вызванной трематодами *Clonorchis sinensis* и *Opisthorchis viverrini* (Flavell, Lucas, 1982, Sripa et al., 2007; Aunpromma et al., 2012) и классифицированных международным агентством по исследованию рака как канцерогенные факторы первой группы опасности (IARC, 2012)]. В отличие от своих ближайших родственных видов, *Opisthorchis felineus* на данный момент по классификации IARC отнесен к канцерогенам третьей группы опасности, как потенциально опасные для человека (IARC, 2012; WHO, 2015), что, вероятно, может быть связано с небольшим количеством данных. Исследование роли *O. felineus* в формировании опухолей печени на экспериментальной модели описторхоза с использованием золотистых хомячков является одним из важных первых этапов тестирования канцерогенного потенциала этого паразита. При сочетанном воздействии диметилнитрозамина (ДМН) и *O. felineus* после

18 недель от начала эксперимента в печени хомячков формируется холангиофиброз, что является стадией предрака (Максимова и др., 2015). Таким образом, целью нашего исследования явилось оценить канцерогенный потенциал инфекции *O. felineus* у золотистых хомячков при сочетанном действии диметилнитрозамина, а также провести подробный патоморфологический анализ и дать комплексную оценку течения заболевания.

Материалы и методы: Для эксперимента было использовано 78 золотистых хомячков, в возрасте 6–8 недель, которые были разделены на 3 группы:

- 1) контрольная группа (30 животных);
- 2) получала диметилнитрозамин (ДМН) (12 ppm);
- 3) получала ДМН (12 ppm) и была инфицирована 50 метацеркариями *O. felineus*.

Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище.

Наличие инфекции у хомячков проверяли после одного месяца с помощью копроовоскопии (Pavlyukov I.A., Berezantsev Y.A., 1991). Доза ДМН была выбрана в соответствии с опубликованными ранее данными (Songserm N. et al., 2009).

Животных выводили из эксперимента путем эвтаназии (CO_2) на 10, 14, 18, 22, 26, и 30 неделю после инфицирования. Объектом исследования служила печень. Образцы тканей фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина, обезживали в серии спиртов возрастающей концентрации и ксилолах (STP-120, Thermo Scientific), после заключали в парафиновую среду HISTOMIX (BioVitrum). Для гистологического и иммуногистохимического анализа (ИГХ) срезы толщиной 4–5 мкм приготавливали на автоматическом ротационном микротоме Microm HM 355S (Thermo Scientific). Использовали обзорную окраску гематоксилином и эозином, а для ИГХ-анализа использовали специфические первичные антитела Ext1, Anx1 и CK7. Визуализацию проводили на микроскопе Axioskop 2 Plus (Zeiss) с фотокамерой AxioCam MRc (Zeiss).

Для морфометрии использовали закрытую тестовую систему из 100 точек площадью 3.52×10^4 мкм². Определяли объемную плот-

ность (Vv) деструктивных изменений, а также численную плотность (Nai) клеток печени различного гистогенеза, экспрессирующих исследуемые маркеры. Средние величины исследованных параметров определяли с помощью пакета программ Statistica 6.0 (Statsoft). Достоверными отличия считали при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение: Макроскопическое исследование печени показало выраженные различия в цвете ткани, состоянии желчных протоков и цвета желчи между группами. Одним из основных показателей является состояние поверхности печени и ее краев. В контрольной группе и в ДМН-обработанной группе (группа 2), поверхность печени остается упругой, гладкой и блестящей, а края печени хорошо выражены, в то время как стенки внепеченочных желчных протоков и желчного пузыря были прозрачными; желчь была прозрачной и светло-желтого цвета в течение почти всего эксперимента. Только к концу эксперимента, через 26 и 30 недель, в группе 2 края печени изменили очертания. Желчные протоки у хомяков с описторхозом (3 группа) были значительно утолщены и имели не прозрачные стенки. Поверхность печени была неровной (небольшие шишки), края органа стали неравномерными, а желчь приобрела темно-зеленый цвет.

Также была проведена комплексная оценка: воспаления; дисплазии, гиперплазии и пролиферации желчных протоков; перидуктального фиброза; количества гранулем с яйцами *O. felinus*, кист, холангиофиброза и холангиокарциномы в течение 30 недель. У животных, получавших только ДМН, отмечена дисплазия гепатоцитов и слабое воспаление, степень которых увеличивается с течением срока эксперимента. Начиная с 22-й недели была зафиксирована небольшая пролиферация желчных протоков. Однако в целом, у животных 2 группы не было активной пролиферации клеток эпителия желчных протоков и признаков перидуктального фиброза, образования гранулем, гиперплазии желчных протоков. В конце эксперимента, на 30 неделе, было отмечено появление холангиокарцином у половины животных, у этих же животных слабо выраженный холангиофиброз, дисплазия печеночных протоков, а также образование цист из уплощенного эпителия.

В 3 группе, находящейся под сочетанным влиянием *O. felineus* и ДМН, воспалительный процесс был выражен сильнее, чем у животных 2 группы. Увеличена степень дисплазии гепатоцитов и воспалительной инфильтрации на протяжении всего срока эксперимента. На 18-й неделе обнаружены цисты, выстланные плоским эпителием. У большинства животных обнаружен холангиофиброз. На этом же сроке эксперимента были отмечены первые признаки злокачественности патоморфологических образований: — нерегулярность в строении новообразованных желчных ходов; исчезновение базальной мембраны у некоторых протоков; обнаружена холангиокарцинома у одного животного. На 22-й неделе у одного из хомячков была найдена холангиокарцинома на ранней стадии развития ($T_1N_0M_0$). На 26-й неделе у половины хомячков была найдена дифференцированная холангиоцеллюлярная карцинома, которая представляли собой холангиокарциному массового формирования. Опухоль демонстрировала инфильтративный рост. К 30-й неделе у всех животных данной группы были найдены холангиоцеллюлярные опухоли с разной степенью дифференцировки от высокодифференцированной до малодифференцированной опухоли.

При этом, у животных 3 группы (сочетанное воздействие ДМН и *O. felineus*) была повышенная секреция онкомаркеров Ext1, Anx1, но пониженная секреция СК7 по сравнению с контрольной группой. У животных 2 группы секреция онкомаркеров была ниже, чем у сочетанной группы, что, вероятно, подтверждает позитивное влияние *O. felineus* на развитие холангиокарциномы у золотистых хомячков, что согласуется с трехстадийной теорией канцерогенеза. Согласно этой теории, злокачественные опухоли развиваются при синергическом воздействии двух агентов. В модели холангиокарциномы с использованием золотистых хомячков инициатор возникновения злокачественных клеток — ДМН (содержится в большом количестве в окружающей среде, в пище и сигаретном дыме), а *O. Felineus*, вероятно, способствует гиперплазии клеток печени различного гистогенеза. Известно, что печень больных описторхозом значительно увеличивается в размерах, а клетки протоков активно пролиферируют. При данном эксперименте наблюдается близкая картина патологических изменений печени. В нашем исследовании также были вы-

явлены пролиферация желчных протоков, гиперплазия и метаплазия эпителия желчных протоков, холангиофиброз и полипы, что следует рассматривать как состояние предрака. Согласно результатам патоморфологического и морфометрического анализа, модель холангиокарциномы на фоне действия ДМН и *O. felineus* с использованием золотистых хомячков демонстрирует показатели, близкие к обнаруженным у пациентов, страдающих холангиокарциномой на фоне хронического описторхоза.

Таким образом, данная модель может быть использована для тестирования противораковых препаратов, исследования механизмов образования холангиокарциномы, поиска и тестирования существующих молекулярных маркеров для ранней диагностики рака желчных протоков.

РАЗРАБОТКА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ СИГНАТУР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА РАННИХ СТАДИЯХ *

Б. С. Малышев, Е. С. Давидович, М. А. Абдурашитов,
А. А. Евдокимов, Н. А. Сметанникова, В. Л. Ситько, И. А. Рязанкин,
В. В. Кузнецов, А. Г. Акишев, Т. Ф. Хасанов, Н. А. Нетесова,
С. Х. Дегтярев

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

Онкологические заболевания являются одной из основных причин высокой смертности в современном мире и представляют со-

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

бой серьезную медико-социальную проблему. Колоректальный рак (КРР) — один из наиболее часто встречающихся видов онкопатологий. В развитых странах мира ежегодно диагностируется более миллиона случаев этого заболевания и смертность от этой формы рака составляет более 33 % даже в высококвалифицированных с медицинской точки зрения регионах [1].

Как и в случае других онкозаболеваний, выявление этого вида рака на ранних стадиях значительно влияет на успешность лечения. Однако начальные стадии патологии внутренних органов, зачастую не сопровождаются симптомами, определяемыми при наружном осмотре, что делает раннюю диагностику в этих случаях крайне затруднительной. Ввиду чего, для диагностики колоректального рака использование биохимических и генетических методов анализа является более предпочтительным.

Исследования последних десятилетий позволили установить, что в основе возникновения рака лежат генетические факторы, вызывающие дисбаланс экспрессии генов в клетке, в результате чего, происходит неконтролируемый клеточный рост. Немаловажную роль в онкогенезе играют эпигенетические процессы. Наиболее изученным и перспективным для диагностики онкозаболеваний эпигенетическим нарушением, на сегодняшний день, является аберрантное метилирование регуляторных участков ДНК. Аберрантное метилирование хорошо известный процесс, часто выявляемый уже на начальном этапе возникновения опухоли, что делает его одним из наиболее перспективных методов диагностики рака. В связи с чем, в последние годы заметно возросло число исследований, направленных на поиск эпигенетических маркеров, позволяющих как детектировать онкозаболевания, так и контролировать успешность лечения [2].

В настоящее время существует множество методов, позволяющих определять присутствие метильных групп в цитозиновых остатках ДНК. Однако, все они, как правило, трудоемки, дорогостоящи или имеют ряд иных недостатков. Методы полного и ограниченного бисульфитного секвенирования (WGBS и RRBS) недоступны для рядовых лабораторий или использования в диагностических целях. Результаты поиска и выбора оптимальных эпигенетических маркеров

методом ДНК-микрочиповых технологий компании Illumina, в большинстве случаев не согласуются друг с другом. Авторы четырех независимых друг с другом работ, использовали один и тот же ДНК-микрочип для получения данных по метилированию генов в сходных объектах исследования (биопсийный или хирургически отделенный материал из колоректальных опухолей и прилежащих тканей), но при этом панели выбранных генов-биомаркеров оказались совершенно различны. Кроме того, неспецифическая кросс-гибридизация с нецелевыми участками генома в ДНК-чипе может достигать существенных значений (~6,5%), что приводит к искажению количественной оценки степени метилирования [3].

В целях лабораторной диагностики ферментативный метод определения статуса метилирования небольших участков ДНК (или отдельных CG-пар) более эффективен, т.к. прост в исполнении, требует меньшего времени и является более щадящим по сравнению с бисульфитным подходом при сопоставимой чувствительности и качестве получаемых данных [4]. При анализе небольших количеств ДНК, ферментативные способы имеют дополнительное преимущество, связанное с отсутствием значительной деградации ДНК, наблюдаемой при бисульфитной обработке, которая проводится в жестких условиях (высокая температура и сильнощелочная среда).

Настоящее исследование проведено недавно разработанным методом GLAD-ПЦР-анализа. Представленный метод позволил решить две наиболее важные проблемы диагностики: малое количество ДНК, получаемых при выделении из образцов крови, и то, что любой препарат ДНК, полученный от доноров с онкозаболеваниями, содержит не только нуклеиновые кислоты из малигнанных клеток, но и некоторое количество примесной ДНК из нормальных клеток. GLAD-ПЦР-анализ смеси разнородной ДНК позволяет детектировать только сигнал, получаемый в результате амплификации ДНК из опухолевых клеток.

Суть метода можно описать трех стадийной схемой гидролиз-сшивки-ПЦР (см. рис.). Гидролиз геномной ДНК метилзависимой эндонуклеазой *GlaI* по специфическому сайту содержащему 5mCG, фиксирует наличие метилирования ДНК в анализируемых участках.

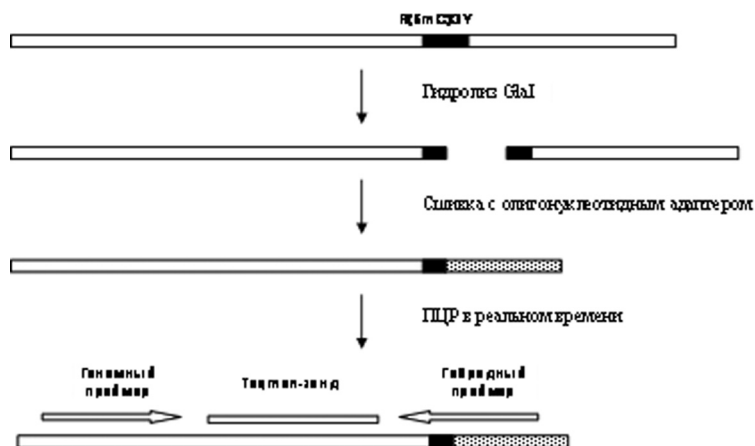


Схема определения статуса метилирования сайта RCGY методом GLAD-ПЦР-анализа. Цвета прямоугольных областей: белый — геномная ДНК, серый — олигодуплексный адаптор, черный — анализируемый сайт RCGY

Сшивка с универсальным олигонуклеотидным дуплексом (адаптором), позволяет в дальнейшем получать сигнал лишь с метилированных фрагментов ДНК и отсеять получение сигнала из примесных неметилированных ДНК здоровых клеток. С помощью гибридного праймера, частично комплементарного последовательности сшитого адаптера (5'-конец), с одной стороны, и небольшому участку геномной последовательности (3'-конец), с другой, происходит амплификация метилированной ДНК. Для детекции сигнала используется метод ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченого Taqman-зонда, что устраняет необходимость проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации, а также дает возможность количественно оценивать число метилированных по анализируемому сайту молекул ДНК путем сравнения с контрольными образцами, содержащими заранее определенные количества молекул ДНК.

Анализ литературных данных последних лет показал 56 генов-онкомаркеров, метилирование которых происходит с высокой частотой в ДНК малигнанных клеток при колоректальном раке. Однако

неоднородность и разнообразие картин метилирования ДНК, присущих одному и тому же типу рака приводит к низкой достоверности статуса метилирования в случае любого отдельного гена. В результате проведенного биоинформатического исследования регуляторных участков каждого из 56 генов, для проведения экспериментального исследования были отобраны 15 участков, удовлетворяющих всем требуемым критериям проведения анализа с помощью метода GLAD-ПЦР и пригодных для использования в диагностической панели генов (сигнатуре).

Проверка чувствительности и специфичности 15 отобранных генов-онкомаркеров проводилась на 15 образцах опухолевой ткани оперированных больных с диагнозом «колоректальный рак». По результатам скрининга обнаружено 9 эпигенетических онкомаркеров имеющих больше 50% метилирования ДНК, коррелирующего с колоректальным раком (см. табл.).

Результаты скрининга эпигенетических онкомаркеров методом GLAD-ПЦР на наличие метилирования, коррелирующего с колоректальным раком, в клинических образцах

Гены-онкомаркеры	RYR2	CNRIP1	ESR1	FBN1	SOCS3	UCHL1	SEPT9b	RXR1	ELMO1
Число выявленных образцов из 15 тестируемых образцов опухолей КРР	15 (100%)	14 (93%)	13 (87%)	13 (87%)	12 (80%)	12 (80%)	11 (73%)	10 (67%)	8 (53%)

Для дальнейшей работы выбраны наиболее перспективные гены RYR2, CNRIP1, ESR1, FBN1, SOCS3 и UCHL1, выявившие от 80 до 100 % исследованных образцов колоректального рака. Созданная из отобранных генов диагностическая панель (сигнатура) позволит диагностировать наличие КРП с высокими показателями чувствительности и специфичности.

Список литературы

1. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer // *Nat Rev Cancer*. 2009. V. 9. P. 489–499.
2. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. [под ред. М. А. Пальцева и Д. В. Залетаева]. М.: изд-во Медицина, 2009.
3. Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray // *Epigenetics*. 2013. V. 8. P. 203–209.
4. Jorda M, Peinado MA. Methods for DNA methylation analysis and applications in colon cancer // *Mutat Res*. 2010. V. 693. P. 84–93.

ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ СПОСОБЫ ОЗДОРОВЛЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ ОТ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ

А. И. Перфильева

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск, Россия

Россия находится в списке стран, возделывающих картофель, занимает второе место — после Китая. Это — более 3 млн. га с урожаем до 37 млн. тонн в год. Средний уровень урожайности картофеля по России составляет около 180 ц/га, однако, потенциальная урожай-

ность картофеля 240 ц/га. Ежегодные потери в России от заболеваний картофеля могут составлять около 10 млн. тонн картофеля, т. е. около 120 000 000 р. Единственным способом повышения рентабельности любой культуры является внедрение интенсивных технологий выращивания, в том числе, усовершенствованных пестицидов. Рынок средств защиты растений в России демонстрирует уверенный рост. Пестицидная нагрузка на 1 га пашни с 2008 по 2010 гг. увеличилась на 0,2 кг и составила 2,9 кг/га. Негативные тенденции, связанные с кризисом и санкциями, а также последствиями засушливого лета года во многом преодолены, что повышает спрос на пестициды.

На сегодняшний день широко распространены различные заболевания картофеля, большинство из которых вызываются патогенными грибами и бактериями. Наблюдаемые в последние десятилетия изменения в температуре окружающей среды способствует расширению ареала особо опасных заболеваний, к примеру, таких, как кольцевая гниль картофеля. До 60% урожая картофеля может быть потеряно из-за заболевания кольцевая гниль картофеля, вызываемого грамположительной бактерией *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*). Во многих странах мира (Канада, США, Европа) данный микроорганизм является карантинным (Eichenlaub, Gartemann, 2011), однако в России эта бактерия не относится к таковым. Мы считаем, что в нашей стране кольцевой гнили уделяется не достаточно внимания, в Московской области уже потери урожая картофеля от поражения *Cms* достигают 30% (Афонин и др., 2006). Предполагается, что в связи с глобальным потеплением ареал возбудителя кольцевой гнили из стран Северной Европы и Канады будет расширяться на Север и Восток, в сторону России.

В настоящее время не существует эффективных и экологически безопасных методов борьбы с фитопатогенными бактериями, все имеющиеся препараты, направлены против фитопатогенных грибов. Для ограничения распространения *Cms* рекомендуются профилактические приемы по снижению численности возбудителя: дезинфекция овощехранилища, инвентаря, клубней перед посадкой. Дезинфекция овощехранилища перед закладкой клубней 2–3%-м раствором медного купороса и хлорной известью (формалином) (Калач и др., 2010).

В овощехранилище должны быть дезинфицирующие барьеры: коврики, пропитанные 5% сульфатом меди. Стены, закрома, потолок, контейнеры и щиты белят 10–20%-ной гашеной известью (Калач и др., 2010). Необходимо обрабатывать колеса автомобильного транспорта хлорной известью (5%-й раствор). Рекомендуется следующая обработка инвентаря: медным купоросом (2–3%-й раствор), изаром (1–2%-й раствор), формалином (2%-й раствор), марганцевокислым калием, хлорной известью, перекисью, аммонием, гидроксидом натрия, альдегидами, сульфатом аммония, хлоридом основным, хлоридфенолом основным, соляной кислотой, органическими кислотами, гипохлоридом натрия, этанолом (70%). Перед посадкой клубни протравливают препаратами ТМТД, поликарбацином (Secor et al., 1988; Анисимов и др., 2009; Калач и др., 2010).

В качестве потенциальных агентов для регулирования численности *Stm* нами впервые были исследованы два вещества: монойодацетат натрия и нанокompозиты селена.

Монойодацетат натрия (МИА) — ингибитор глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Досон и др., 1963) и алкогольдегидрогеназы (Кнорре, Мызина, 1998). В отличие от других пестицидов МИА слабо персистентен и при повышении температуры до 40°C через 2 ч полностью разлагается на уксусную кислоту и йод (Webb., 1963). Известно, что обработка сои МИА способствовала повышению содержания фитоалексинов в ней (Keen et al., 1981). Нами показано, что обработка 1 мМ МИА оказывает ярко выраженный токсический эффект на жизнеспособность клеток *Stm* и грибов. Следовательно, этот агент обладает бактерицидным и фунгицидным эффектом (Рымарева и др., 2008). В то же время, МИА не оказывал отрицательного влияния на прорастание клубней картофеля. В полевых экспериментах, было показано, что предпосадочная обработка МИА может увеличивать продуктивность картофеля (Перфильева и др., 2013). Бактерицидный эффект МИА усиливается при повышении температуры. Поэтому нами в вегетационных и полевых экспериментах было проверено влияние МИА и термообработки (45°C, 1 ч) клубней на вегетацию и продуктивность картофеля. Было показано, что предпосадочная обработка МИА способствовала повышению продуктив-

ности картофеля сорта Луговской (Перфильева и др., 2013). Результаты вегетационных экспериментов показали отсутствие симптомов заболевания у растений картофеля сорта Лукьяновский, клубни которого были термически обработаны до посадки.

Таким образом, учитывая глобальное потепление, происходящее на нашей планете, можно предположить, что температура почвы будет увеличиваться, что повышает актуальность использования МИА. Концентрации агента и способы обработки подобраны экспериментально, проведены лабораторные эксперименты и полевые испытания.

В настоящее время активно изучаются наноматериалы. Интерес вызывают нанокompозиты, представляющие собой частицы селена, помещенные в матрицу из арабиногалактана. Такое сочетание материалов удобно в использовании, так как токсичные частицы селена плотно упакованы полисахаридом и высвобождаются только после расщепления молекулы арабиногалактана. Таким образом, селенсодержащие нанокompозиты сохраняют бактерицидное действие селена, но при этом не токсичны для организма, что обуславливает перспективность их исследования для дальнейшего использования на практике. В настоящей работе нами был использован НК (наночастицы селена, стабилизированные арабиногалактаном), а также его предшественники (арабиногалактан, бис(2фенилэтил)диселенофосфинат натрия) разработанные и синтезируемые в Иркутском институте органической химии им. А. Е. Фаворского СО РАН. Все агенты хорошо растворимы в воде и удобны в использовании. Было показано отсутствие негативного эффекта нанокompозитов на растения картофеля *in vitro* (изменение уровня активности пероксидазы и влияние на прирост растений), а также наличие бактерицидного эффекта исследуемых нанокompозитов на жизнеспособность *Cms* (путем измерения оптической плотности и методом определения КОЕ) и изменение морфологии клеток бактерий после их инкубации с нанокompозитами, что возможно, связано с изменением мембранной проницаемости клеток бактерий в результате влияния нанокompозитов (Parkina et al., 2015; Папкина и др., 2015). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективах исследований нанокompозитов се-

лена в качестве средств для ограничения распространения кольцевой гнили картофеля.

Список литературы

1. Eichenlaub R., Gartemann K.H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annu Rev Phytopathol. 2011. V. 49. P. 445–64.
2. Калач В. И., Жукова М. И., Ильяшенко Д. А., Ерчик В. М., Романович А. С., Криштофик Л. Д. Методические указания по локализации и ликвидации бактериальной кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicum* (Spieckermann and Kotthoff) Davis et al. Самохваловичи: РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», 2010. 12 с.
3. Webb E. C. Enzyme and metabolic inhibitors. New York, 1963. V. 1. 340 p.
4. Keen N. T., Ersek T., Long M., Bruegger B., Holliday M. Inhibition of the hypersensitive reaction of soybean leaves to incompatible *Pseudomonas* spp. by blasticidin Streptomycin or elevated temperature // Physiology Plant Pathology. 1981. V. 18. P. 325–337.
5. Рымарева Е. В., Рихванов Е. Г., Торгашина М. А., Перфильева А. И., Копытчук В. Н., Варакина Н. Н. Влияние моноацетата на термотолерантность *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* и дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* // J. of Stress Physiology & Biochemistry. 2008. V. 4. №. 2. P. 4–13.
6. Перфильева А. И., Рымарева Е. В., Рихванов Е. Г. Влияние моноацетата натрия и тепловой обработки на продуктивность картофеля в вегетационных и полевых опытах // Агрохимия. 2013. № 6. С. 54–60.
7. Папкина А. В., Перфильева А. И., Живетьев М. А., Боровский Г. Б., Граскова И. А., Лесничая М. В., Клименков И. В., Сухов Б. Г., Трофимов Б. А. Влияние нанокompозита селена и арабиногалактана на жизнеспособность фитопатогена *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Доклады академии наук, 2015, том 461, № 2, С. 239–241.

8. Papkina A.V., Perfileva A.I., Zhivet'yev M.A., Borovskii G.B., Graskova I.A., Klimenkov I.V., Lesnichaya M.V., Sukhov B.G., Trofimov B.A. Complex effects of selenium-arabinogalactan nanocomposite on both phytopathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* and potato plants // Nanotechnologies in Russia, 2015, V. 10, (5–6), P. 484–491.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ВЫСШИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

М. А. Проценко

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

Изменение условий существования человечества, связанное с воздействием химических, биологических и физических факторов окружающей среды, привело и продолжает приводить к снижению адаптационных возможностей человеческого организма и его способностей к сопротивляемости и как следствие этого — плохое состояние здоровья населения и неблагоприятный прогноз. Все это требует расширения спектра доступных и эффективных лекарственных средств.

Исходя из этого, разработка новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов является одной из важнейших задач современной фармакологии и биотехнологии. Следует признать, что при наличии современных технологий, спектр противоопухолевых и противовирусных препаратов настолько узкий, что практически не дает право выбора для пациентов. Лекарственные препараты для лечения онкологических заболеваний и вирусных инфекций, используемые в официальной медицине, в основном токсичны, дорогостоящи и обладают узконаправленным действием при наличии побочных эффектов.

Неоднозначность проблемы проявляется в том, что фармакологии вновь возвращаются к тысячелетнему опыту древних врачей — к лекарственным средствам из природной среды. Препараты

природного происхождения по сравнению с синтетическими лекарственными средствами обладают мягким терапевтическим действием и низкой токсичностью при практически полном отсутствии побочных эффектов.

Перспективны в качестве природного сырья грибы отдела базидиомицеты для разработки новых лекарственных препаратов. Базидиальные грибы представляют огромный потенциал в качестве источников биологически активных метаболитов: полисахаридов, белков, терпенов, меланинов фенольных соединений и др. Сложность и многообразие химического состава базидиомицетов и обуславливает их широкий спектр действия на организм.

Тем не менее, несмотря на возрастающее количество публикаций, описывающих наличие биологической активности грибов, лекарственные препараты на основе высших базидиомицетов практически отсутствуют на фармацевтическом рынке Российской Федерации. При этом лекарственных средств, получаемых на основе растений, существует значительное количество.

Цель работы. Разработка методов препаративного выделения комплекса биологически активных веществ из базидиальных грибов, проявляющих противовирусную и противоопухолевую активность, качественный и количественный анализ химического состава полученных экстрактов.

Задачи

- разработка экологически безопасной и безотходной технологии выделения комплекса биологически активных соединений из базидиомицетов.
- выделение в чистую культуру гриба *Daedaleopsis tricolor*.
- разработка методик анализа групп БАВ в препаратах из высших грибов
- анализ физико-химических параметров полученных препаратов, полученных из высших базидиомицетов.
- исследование биологической активности препаратов из базидиомицетов.

На сегодняшний день имеется обширный спектр публикаций, в которых описаны результаты исследований по разработке и оптимизации

технологии извлечения БАВ из растительного сырья. Однако при этом существуют лишь единицы публикаций, посвященных оптимизации технологических параметров извлечения БАВ из грибного сырья. Учитывая значительные морфологические и анатомические отличия между растениями и грибами, технология выделения БАВ из грибного сырья имеет свои особенности и отличия. Нами разработана универсальная технология выделения спектра БАВ из высших базидиомицетов.

Процесс перевода природного объекта в чистую культуру нацелен как на создание штаммов-продуцентов для нужд биотехнологии, так и на благородную миссию сохранения биоразнообразия природы. Создание препаратов на основе культивируемого мицелия гриба обладает рядом преимуществ, связанных с тем, что качество сырья и выход БАВ контролируется биотехнологическими методами путем изменения состава питательной среды и условий культивирования.

Для создания новых лекарственных препаратов на основе биотехнологии необходимы эффективные штаммы-продуценты биомассы. В качестве одного из таких источников перспективен дереворазрушающий базидиомицет Дедалеопсис трехцветный *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev & Singer 1941. Известно, что БАВ из плодовых тел этого гриба проявляют противоопухолевую, антиоксидантную и слабую антибактериальную активность. При этом практически отсутствуют данные о культивировании данного гриба в чистой культуре. Наличие выявленной биологической активности делает *Daedaleopsis tricolor* перспективным для отбора новых штаммов гриба в чистую культуру и изучения их в стационарных и динамических условиях культивирования на жидкой среде.

Для выделения *Daedaleopsis tricolor* в чистую культуру были собраны плодовые тела гриба в лесных массивах Новосибирской области в 2013 г. Тканевым методом были выделены три штамма ксилотрофного гриба *Daedaleopsis tricolor*. На следующем этапе полученные культуры *Daedaleopsis tricolor* очищали от микофильных грибов путем многократных последовательных пересевов с одной с одной чашки с агаризованной средой на другую.

Культивируемые грибы при соблюдении правил биотехнологии сохраняют способность к синтезу БАВ. Однако при этом могут на-

блюдаться как количественные, так и качественные изменения в составе комплекса синтезируемых БАВ.

Оптимизация процесса культивирования гриба путем изменения состава питательной среды и условий проведения данной биотехнологической стадии позволяет получить мицелий с требуемым биохимическим составом для повышения его биологической активности. Выращивание мицелия гриба *Daedaleopsis tricolor* в стационарных и динамических условиях осуществляли на среде с глюкозой и соевой мукой, среде содержащей крахмал и кукурузный экстракт и на глюкозопептонной среде.

Одним из важнейших этапов создания лекарственных препаратов является разработка методов их стандартизации по группам БАВ. Инструментальные методы анализа, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, газожидкостная хроматография, хромато-масс-спектрометрия, обладают высокой чувствительностью и позволяют устанавливать структуру БАВ. При этом используется дорогостоящее оборудование и требуется затратная по времени и ресурсам пробоподготовка. Для характеристики препаратов сотрудниками сектора биохимии были разработаны экспресс-методики анализа полисахаридов, белка, каротиноидов, тритерпенов, фенольных соединений и флавоноидов с использованием доступного общелабораторного оборудования.

К особенностям разработанных методик относятся простота, быстрота, использование общелабораторного оборудования, малые объемы исследуемых проб и реактивов. Предложенные методики позволяют проводить серийные анализы в несколько десятков образцов. Валидационную оценку методик проводили по параметрам: линейность, правильность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность.

Разработанные нами методики использовали для характеристики полученных препаратов в виде сухих экстрактов *Daedaleopsis tricolor* по содержанию полисахаридов, общего белка, фенольных соединений, флавоноидов и каротиноидов.

На заключительном этапе проводили анализ биологической активности приготовленных препаратов (экстрактов) *in vitro*. Исследовали

их антиоксидантную, противоопухолевую и противовирусную активности. Перед контролем экстрактов на противоопухолевую и противовирусную активности, оценивали их токсичность на перевиваемых клеточных линиях Vero и MDCK.

Обнаружено, что экстракты *Daedaleopsis tricolor* в концентрациях ниже 1,25 мг/мл не проявляли токсического действия на перевиваемые клетки MDSC и Vero. Установлено, что наибольшую антиоксидантную активность проявили водные экстракты из культивируемого мицелия *Daedaleopsis tricolor*. При исследовании цитотоксической активности на культуре клеток Нер-2 (карцинома гортани человека), было выявлено, что концентрация, ингибирующая рост клеток на 50% (IC_{50}), водного экстракта из плодового тела гриба находилась в пределах 200–300 мкг/мл, а IC_{50} экстракта из мицелия — 100–115 мкг/мл. Таким образом, водный экстракт мицелия проявлял более высокую противоопухолевую активность в отношении клеточной линии Нер-2, чем экстракт из плодового тела гриба. Показана некоторая противовирусная активность этанольных экстрактов плодового тела и мицелия *Daedaleopsis tricolor* (штамм Db-14) in vitro в отношении вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) и вируса простого герпеса 2-го типа (штамм MS) на клеточной линии Vero. При этом водные экстракты *Daedaleopsis tricolor* заметной противовирусной активности не проявляли.

Выводы

- Разработана экологически безопасная оптимальная технология выделения широкого спектра БАВ из высших базидиомицетов.
- В чистую культуру введено три штамма гриба *Daedaleopsis tricolor* из природных местообитаний Новосибирской области. Штаммы Db-14 (коллекционный номер F-1315) и Db-18 (коллекционный номер F-1314) депонированы в коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».
- Проведено исследование, определяющее биотехнологию глубинного культивирования созданных штаммов гриба *Daedaleopsis tricolor*, как наиболее перспективную.
- Разработаны и апробированы экспресс-методики анализа групп БАВ в экстрактах базидиомицетов. Валидация разработанных методик показала их соответствие критериям приемлемости.

• Препараты, полученные из плодовых тел и сухой биомассы мицелия *Daedaleopsis tricolor*, охарактеризованы по основным группам БАВ.

• Выявлены антиоксидантная, цитотоксическая и противовирусная активности препаратов из плодовых тел и мицелия *Daedaleopsis tricolor*.

• Показано, что препараты, полученные из культивируемого мицелия гриба *Daedaleopsis tricolor*, в большинстве случаев показывают биологическую активность выше, чем препараты, выделенные из плодовых тел.

• Штамм *Daedaleopsis tricolor* Db-14 — перспективный биотехнологический источник для разработки и получения новых лекарственных препаратов.

ФОРМОВАННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ: СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Л. Г. Пьянова^{1,2}, О. Н. Бакланова¹, А. В. Седанова¹,
С. В. Баринов³, О. В. Баракина³, В. Т. Долгих³

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем переработки углеводов Сибирского
отделения Российской академии наук (ИППУ СО РАН),

² Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение Высшего профессионального образования «Омский
государственный технический университет» (ОмГТУ),

³ Государственное бюджетное образовательное учреждение
Высшего профессионального образования
«Омский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ (ОмГМУ)

Одной из актуальных проблем современного акушерства и гинекологии во многих странах остаются гнойно-воспалительные за-

болевания. Несмотря на многочисленные научные исследования, посвященные данной проблеме, а также внедрение новых методов диагностики и терапии, инфекционные осложнения послеродового периода сохраняют свою значимость. Эндометрит — наиболее распространенная форма инфекции, связанная с воспалительными процессами в слизистой оболочке матки или эндометрии. Широкое применение антибиотикотерапии и антибиотикопрофилактики не решает проблему септических осложнений пуэрперии: частота развития эндометрита в настоящее время не снижается. Очевидно, разработка новых подходов и препаратов для лечения и профилактики, отличающихся по механизму действия от антибиотиков и обладающих высокой антимикробной активностью, является актуальной задачей.

В настоящее время одним из приоритетных направлений медицины является сорбционная терапия, в частности аппликационная сорбция (вulnerable сорбция) [1–3]. Особый интерес представляют собой углеродные сорбенты, давно применяемые в медицине и фармацевтике. Область применения углеродных сорбентов постоянно расширяется, чему способствуют высокая биосовместимость углерода, а также наличие у данных сорбентов развитой структуры с регулируемыми размерами пор, обуславливающих их высокую адсорбционную способность по отношению к токсичным веществам [4–5].

В работе приведены результаты исследований изделий медицинского назначения, разработанных в Институте проблем переработки углеводов СО РАН. Описана технология получения изделий, приведены схемы синтеза. Представлены результаты исследований физико-химических и медико-биологических испытаний формованных углеродных сорбентов.

Микробиологические испытания «in vitro» показали наличие антибактериальных свойств у углеродных сорбентов. Клинические испытания показали, что после проведения традиционной антибиотикопрофилактики из полости матки продолжает определяться патогенная микрофлора более чем в 50 % случаев. Сохраняется достаточно высокий уровень местных провоспалительных цитокинов, что

создает угрозу развития отсроченных, вялотекущих, стертых форм эндометритов с хронизацией процесса. Предложенный способ профилактики эндометрита у пациенток с инфекционным риском с помощью внутриматочного введения пористого углеродного аппликатора является более эффективным по сравнению с традиционным подходом и позволяет улучшить результаты лечения за счет полной элиминации патогенных возбудителей из полости матки и снижения уровня местных провоспалительных цитокинов.

Разработана новая форма изделий медицинского назначения — формованные углеродные сорбенты, которые являются перспективными материалом для вульнеросорбции («Формованный сорбент ВНИИТУ-1» регистрационный номер РЗН 2015/2967; «Формованный сорбент ВНИИТУ-1ПВП регистрационный номер РЗН 2015/2969).

Список литературы

1. Самсонов К. В. Сравнительная эффективность сорбции бактерий и бактериальных токсинов углеродными и углерод-минеральными сорбентами. Бюл. физиологии и патологии дыхания 2008; Вып. 29: 48–50.
2. Belik E. V., Brykalov A. V., Bostanova F. A. et al. Fabrication and study of biologically active organosilica polymer composites used for application sorption. Fibre Chemistry 2008. Vol. 40; № 5: 445–446.
3. Levashov P. A., Afanasieva O. I., Dmitrieva O. A. et al. Preparation of affinity sorbents with immobilized synthetic ligands for therapeutic apheresis. Biochemistry 2010; Vol. 4; № 3: 303–307.
4. Коваленко Г. А., Семиколенов В. А., Кузнецова Е. В. и др. Углеродные материалы как адсорбенты для биологически активных веществ и бактериальных клеток. Коллоидный журнал 1999; Т. 61; № 6: 787–795.
5. Лисичкин Г. В. Химия привитых поверхностных соединений / Г. В. Лисичкин. М.: Физматлит, 2003.

ФАКТОР МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА, СТИМУЛИРУЮЩИЙ ОБРАЗОВАНИЕ БИСПЕЦИФИЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ*

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

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирский государственный университет*

Получение биспецифичных иммуноглобулинов для терапевтических целей является важной задачей современной фармакологии и биотехнологии: в 2014 году журнал *Nature Reviews Drug Discovery* назвал такие терапевтические молекулы названы «антителами нового поколения».

Сравнительно недавно было показано, что в результате восстановления дисульфидных связей между тяжелыми цепями, диссоциации HL-фрагментов (тяжелых и легких цепей, соединенных дисульфидными связями), и реассоциации HL-фрагментов с различными антигенсвязывающими центрами, образуются биспецифичные молекулы иммуноглобулинов. Этот процесс получил название обмена HL-фрагментами и описан в научной литературе *in vivo* и *in vitro*. Согласно литературным данным, в крови человека и других млекопитающих обмен HL-фрагментами происходит только между молекулами IgG4, причем обмениваться могут как природные, так и моноклональные антитела, использующиеся для специфической терапии. Интересно, что такой обмен HL-фрагментами между IgG4 может происходить между и *in vitro*, в присутствии восстановленного глутатиона.

Ранее мы показали, что молоко человека содержит белковый фактор, стимулирующий обмен иммуноглобулинов структурными компонентами — HL-фрагментами, но не свободными тяжелыми

* Исследование частично поддержано грантами РФФИ: проекты 13-04-00205, 13-04-00208.

или легкими цепями. В результате обмена половинами молекул, IgG и sIgA молока человека становятся би- и полиспецифичными, связывают сорбенты с иммобилизованной ДНК, АТФ, липидами, казеином и катализируют реакции гидролиза ДНК, АТФ, олигосахаридов, фосфорилируют липиды, олигосахариды и казеин. Причем, в молоке человека *in vivo*, а также в присутствии плазмы молока человека *in vitro* с участием восстановленного глутатиона обмениваются не только IgG4, но и остальные подклассы IgG, а также sIgA. Уровень образования химерных антител, содержащих одновременно легкие цепи типа каппа и лямбда, в молоке достигает 50 %. Мы показали, что иммуноглобулины классов G и A молока человека *in vitro* в присутствии восстановленного глутатиона, а также плазмы молока человека, содержащий неизвестный в настоящее время фактор, эффективно обмениваются половинами молекул.

Би- и полиспецифичные иммуноглобулины молока не могут выполнять функции, присущие иммуноглобулинам крови, но в то же время могут играть совершенно другую роль. Известно, что антитела молока человека действуют в основном в кишечнике ребенка и не попадают в кровь. Таким образом, этот феномен может значительно расширить современные представления о роли иммуноглобулинов молока в организме ребенка.

Дальнейшие исследования будут направлены на изучение фактора молока, благоприятствующего обмену HL-фрагментами, а также на разработку новых способов получения биспецифичных иммуноглобулинов.

КЛОНИРОВАНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ M.AGS I, M.ALUB I И M.FAT I, УЗНАЮЩИХ И УНИКАЛЬНО МОДИФИЦИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК TTSA(M6A), (M6A)GCT И (M5C)ATG СООТВЕТСТВЕННО *

Е. Н. Ширяева, М. А. Абдурашитов, Д. А. Гончар, С. Х. Дегтярёв,
В. С. Дедков, Е. Н. Ломаковская, Н. А. Михненко, Г. В. Мутыло,
С. Г. Удальева, Л. А. Урюмцева, В. А. Чернухин

ООО «СибЭнзайм», Новосибирск

Новые ДНК-метилтрансферазы являются перспективными инструментами для изучения метилирования ДНК в биологии и медицине. В бактериальных системах рестрикции-модификации ДНК-метилтрансферазы защищают хозяйскую ДНК от сопряжённых эндонуклеаз рестрикции.

Данные о том, что выбранные ДНК-метилтрансферазы уникальны, основывались на свойствах сопряжённых эндонуклеаз. Так, *AgsI* не имеет изошизомеров, следовательно, и сопряжённая ДНК-метилтрансфераза должна быть прототипом. *AluBI* и *FatI* являются изошизомерами *AluI* и *NlaIII*, однако, расщепляют ДНК штаммов-прототипов. Это указывает на уникальность сопряжённых ДНК-метилтрансфераз продуцентов изошизомеров. Гены ДНК-метилтрансфераз из *Agrococcus species 25*, *Arthrobacter luteus* В и *Flavobacterium aquatile* NL3 клонировали в *E. coli* RR1- в составе вектора pUC19. Продуценты отбирали по устойчивости ДНК плазмид к сопряжённым эндонуклеазам. Рекомбинантные плазмиды показаны на рис. 1.

* Работа проводилась при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации по Соглашению № 14.576.21.0077 от 06.11.2014 г. (уникальный идентификатор RFMEFI57614X0077), заключенному в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы».

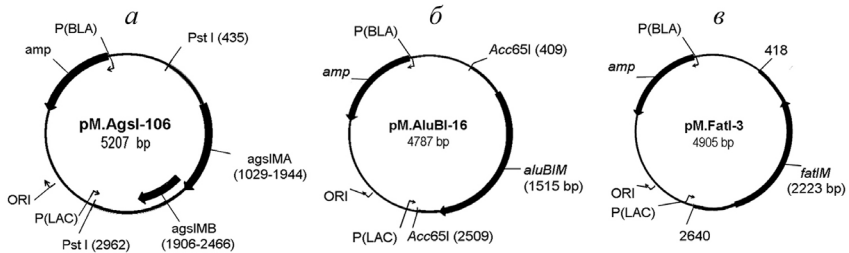


Рис. 1. Карты рекомбинантных плазмид, кодирующих М.AgsI (а), М.AluBI (б) и М.FatI (в): тонкая линия — pUC19 ДНК, жирная — встро-енная ДНК; ORI — точка начала репликации; P(BLA) — промотор гена β-лактомазы, amp — ген устойчивости к ампициллину, P(LAC) — про-мотор гена β-галактозидазы, agsI MA, agsI MB, aluBI M и fatI M — гены ДНК-метилтрансфераз

ДНК рекомбинантных плазмид секвенировали и открытые рамки трансляции (ОРТ) определили. По программе BLAST определили, что белки генов М.AgsI и М.AluBI относятся к **аминометилтрансфе-разам**, а белок М.FatI — к цитозин (C5)-ДНК-метилтрансферазам. М.AgsI, узнающая TTSAА, по-видимому, состоит из двух субъединиц. На рис. 2 показано выравнивание аминокислотных последователь-ностей М.AgsIA и М.AgsIB с М.TaqI, образующей TCG(m6A). Среди мотивов ДНК-метилтрансфераз в М.AgsIB выявили мотив I (A-G-G) для связывания SAM, а в М.AgsIA — **мотив IV (NPPF) для катали-за**. В настоящее время известны лишь три ДНК-метилтрансферазы М.AquI, М.EaeI, М.EcoHK3II, которые состоят из двух субъединиц. Все они относятся к классу цитозин (C5)-ДНК-метилтрансфераз. М.AgsI, таким образом, может являться первой субъединичной аденин-(N6)-ДНК-метилтрансферазой.

Биомассы рекомбинантных продуцентов нарабатывали. Из них при помощи хроматографических процедур выделяли препараты ДНК-метилтрансфераз, пригодные для молекулярно-генетических работ. По защите от сопряжённых эндонуклеаз определили опти-мальные условия активности ферментов.

Специфичность ДНК-метилтрансфераз определяли путём мече-ния посредством [3H]-SAM оснований в олигонуклеотидах, кото-

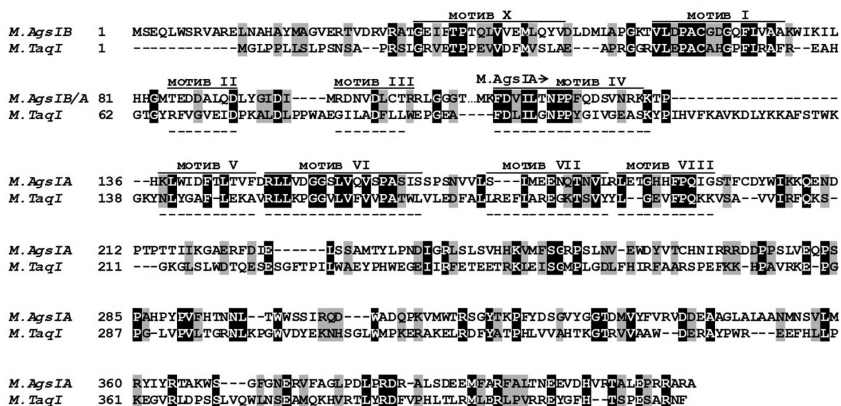


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей субъединиц M.AgsI с M.TaqI и выявление консервативных мотивов аминотилаз

рые затем расщепляли по сайтам метилирования эндонуклеазами рестрикции II-типа. Также метилируемые основания определяли путём блокирования активности эндонуклеаз рестрикции на ДНК фагов λ и T7, метилированных M.AgsI, M.AluBI и M.FatI.

Таким образом, результаты анализа аминокислотных последовательностей, ^3H -мечения метилируемых оснований, «зондирования» метилированных сайтов эндонуклеазами рестрикции — показали, что M.AgsI образует 5'-TTSA(m6A)-3' на ДНК, M.AluBI — 5'-(m6A)GCT-3', M.FatI — 5'-(m5C)ATG-3'. Все три ДНК-метилтрансферазы обладают новой специфичностью и вполне могут представлять интерес для молекулярно-генетических работ.

ДНК фагов λ и T7 метилированные M.AgsI, M.AluBI и M.FatI использовали для определения специфичности ряда эндонуклеаз рестрикции, производимых в РФ, к новым видам метилирования. Полученные результаты расширяют возможности применения промышленных эндонуклеаз рестрикции для изучения метилирования ДНК.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ESCHERICHIA COLI И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

Э. Т. Тайлакова, О. В. Червякова, К. Т. Султанкулова

РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности КН МОН РК, пгт Гвардейский Жамбылской области, Казахстан

Оспа овец это тяжелое, высококонтагиозное заболевание, которое согласно МЭБ относят к особо опасным болезням животных. Заболевание наносит овцеводству огромный экономический ущерб, состоящий из гибели и вынужденного убоя больных животных, снижения продуктивности, затрат на проведение ветеринарно-санитарных и охранно-карантинных мероприятий.

Решающая роль в борьбе с инфекционными болезнями животных отводится специфической профилактике с использованием живых и инактивированных вакцин. Исследования по созданию вакцин нового поколения против капripоксвирусов имеют важное значение для сельского хозяйства Казахстана, где основу животноводства составляет овцеводство.

В настоящее время для профилактики оспы овец в Республике Казахстан и в ряде стран ближнего зарубежья используют культуральную вакцину, полученную на основе аттенуированного вируса оспы овец (ВОО), штамм «НИСХИ». Однако ограничения на использование живых аттенуированных вакцин в районах благополучных по данному заболеванию и их недостатки такие как: реактогенность, сохранение риска остаточной вирулентности, возможная генетическая нестабильность, приводящая к возвращению свойств патогенности, их биологическая нестабильность при хранении и использовании, а также аллергенное воздействие на некоторых вакцинируемых, создают необходимость разработки профилактических препаратов нового поколения.

Последним достижением молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии стало создание вакцин, содержащих высокоиммуногенные вирусные белки. Получение вакцин на основе рекомбинантных белков является новейшим поколением профилактических препаратов. Субъединичные вирусные вакцины обычно являются набором или отдельным поверхностным протективным вирусным белком. Обладая протективной активностью эти антигены способны обеспечить развитие устойчивости иммунизируемого организма к последующему инфицированию. Главным преимуществом данного типа вакцин является их низкая реактогенность, что обуславливает их широкое применение в медицине и ветеринарии для вакцинации населения и сельскохозяйственных животных.

Целью данной работы является получение рекомбинантных белков обладающих иммуногенными свойствами для разработки высокоэффективного средства специфической профилактики против оспы овец.

В данных исследованиях белки вируса оспы овец выбраны по гомологии с изученными иммуногенными белками вируса коровьей оспы A4, A27, A33, B5, L1, H3.

На первом этапе исследований был проведен анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов целевых белков ВОО на наличие трансмембранных доменов. В результате установлено, что четыре белка SPPV060 (ортолог L1), SPPV074 (ортолог H3), SPPV122(ортолог A33) и SPPV141(ортолог B5) имеют трансмембранные домены на N- или C-конце. Тогда как в аминокислотных последовательностях белков SPPV095 (ортолог A4) и SPPV117 (ортолог A27) эти домены отсутствовали. С учетом результатов анализа были сконструированы праймеры. Для возможности последующего клонирования целевых генов в экспрессирующие плазмиды в последовательности праймеров были внесены соответствующие сайты рестрикции. С использованием подобранных праймеров были амплифицированы целевые гены, которые далее клонировали в экспрессирующий вектор pET26b(+) или pET28b(+).

В результате было получено 6 конструкций (pSPPV060ΔTM, pSPPV074ΔTM, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122ΔTM

и pSPPV141ΔTM) для экспрессии генов вируса оспы овец под контролем промотора T7 в бактериальной системе *E.coli* штамм T7.

Для очистки и детекции рекомбинантных белков аминокислотные последовательности были модифицированы путем добавления на С-конце шести молекул гистидина HIS-Tag6.

В результате индукции бактериальных клеток, содержащих рекомбинантные плазмиды pSPPV060ΔTM, pSPPV074ΔTM, pSPPV095, pSPPV117, pSPPV122ΔTM и pSPPV141ΔTM, установлена экспрессия белков, молекулярный вес которых соответствовал расчетным значениям для SPPV060, SPPV074, SPPV095, SPPV117, SPPV122 и SPPV141 — 22, 30, 20, 19, 17 и 22 кДа, соответственно. Подобран оптимальный протокол индукции экспрессии для каждого гена, обеспечивающий высокий выход рекомбинантного белка. Анализ клеточных лизатов методом вестерн блота с использованием анти-HIS мышинных иммуноглобулинов подтвердил наличие экспрессии целевых белков. Все полученные рекомбинантные белки специфически связывались с антителами к полигистидину. Кроме того, все полученные белки специфически выявлялись сывороткой от экспериментально инфицированных ВОО овец. Также было установлено, что рекомбинантные белки SPPV060, SPPV074, SPPV117, SPPV122 и SPPV141 в организме животных вызывают образование антител с вируснейтрализующей активностью.

Исследования выполнены в рамках проекта грантового финансирования Г.2015/0115РК01983 «Рекомбинантная вакцина для профилактики оспы овец».

Выполнение исследований по теме обеспечит разработку высокоэффективного средства специфической профилактики нового поколения против оспы овец, являющегося одним из основных моментов в улучшении благосостояния страны по особо опасным инфекционным заболеваниям.

ПОЛУЧЕНИЕ БИБЛИОТЕКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ НИТЧАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ M13 ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭКСПРЕСС ТЕСТ ПОЛОСКИ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГЕПАТИТА С

Н. В. Волкова

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

Начиная с 1989 года, когда впервые был выделен вирус гепатита С, его распространенность в мире постоянно растет, и, согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), на данный момент достигает 130–200 миллионов случаев. Около 350 000 человек ежегодно умирают от последствий гепатита С. Эпидемия гепатита С — одна из самых серьезных угроз для общественного здравоохранения.

В России постоянно регистрируются новые случаи инфицирования, и в то же время не уделяется достаточного внимания профилактике данного заболевания. В настоящее время вакцины от гепатита С не существует, но в этой области ведутся научные исследования[1]

Поскольку острая инфекция вируса гепатита С обычно протекает без симптомов, инфекции вируса гепатита С редко диагностируется на раннем этапе. Хотя диагностирование на раннем этапе может предотвратить проблемы со здоровьем, которые могут возникнуть вследствие инфекции, и предотвратить передачу вируса.

Современные методы диагностики слишком дороги и недостаточно точны, а также занимают много времени [2]. На данный момент для диагностики используется иммуноферментный анализ и ПЦР. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Однако слабым местом этого метода являются используемые коммерческие антигены — они слишком дороги. Немало важным недостатком является время диагностики на наличие антител. Чтобы сделать диагностику на наличие в крови антител против гепатита С человеку нужно идти в больницу и затем, спустя время известны только результаты.

Поэтому мы предлагаем альтернативный подход с использованием нитчатых бактериофагов, как векторов презентации иммуногенов вируса и выявления с помощью их антител против гепатита С.

Достигается это путем встройки пептидов в рПБ белок нитчатых бактериофагов, что позволит вместо химического синтеза, который значительно увеличивает цену, использовать биологическую амплификацию для наработки антигена. Бактериофаги один из самых простых и удобных молекулярно-биологических систем амплификации и экспрессии пептидов.

Отдел биоинженерии ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», возглавляемая профессором Ильичевым А. А., была первой в России и одной из первых в мире, где начались исследования по фаговому дисплею. Под руководством Ильичева А. А. впервые в мире была проведена работа по встройке чужеродного пептида в основной белок нитчатого бактериофага М13 — рПБ, было показано что этот белок может быть использован для получения фаговых пептидных библиотек. Разработан ряд уникальных векторных систем для дисплея пептидов и белков в составе нитчатых бактериофагов. При помощи фаговых библиотек найден ряд антител представляющих диагностическую и терапевтическую ценность.[3]

Встраивание пептидов производилось следующим образом, сначала производился ферментативный гидролиз репликативной формы бактериофага М13 и олигонуклеотидов, входящих в поверхностный белок вируса гепатита С. Ферментативный гидролиз проводили по определенным сайтам рестрикции. Затем производили лигирование («сшивку») олигонуклеотида и репликативной формы бактериофага М13.

В настоящее время встроены три пептида в рПБ белок бактериофага М13. В дальнейшем данные пептиды будут проверены с помощью дот-блота на связывание с антителами, содержащимися в сыворотки крови.

Главное преимущество нашего экспресс теста перед существующими методами диагностики заключается в том, что встройка пептидов в некоторые белки бактериофагов не влияет на их жизнеспособность, и в то же время позволяет получить химерные вирусные частицы, несущие на своей поверхности желаемые пептиды. Далее, путем конкурентного отбора будут выбраны наиболее эффективные

и чувствительные пептиды, которые и будут использоваться для выявления антител против вируса гепатита С.

Разрабатываемый экспресс тест будет использоваться в исследовательских и медицинских лабораториях, а так же для бытового применения.

Список литературы

1. В. В. Серов, З. Г. Апросина //Хронический вирусный гепатит — М.: Медицина, 2004. 384 с.; ил

1. Пименов Н.Н, Чуланов В.П., Комарова С.В., Карандашова И.В., Неверов А.Д., Михайловская Г.В., Долгин В.А., Лебедева Е.Б., Пашкина К.В., Коршунова Г.С. (2012) Гепатит С в России: эпидемиологическая характеристика и пути совершенствования диагностики и надзора. Эпидемиология и инфекционные болезни, № 3, 2012, с. 4–10.

2. Отбор методом фагового дисплея и анализ пептидов, узнаваемых широконейтрализующим антителом VRC01 Щербаков Д.Н., Волкова Н.В., Бакулина А, Щербакова Н.С., Чикаев А.Н., Рудометов А.П. Инфекция и иммунитет, специальный выпуск 2014, с 107.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО АПОПТИН, НА МОДЕЛИ ИСКУССТВЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ КАРЦИНОМЫ A431 *

А. Ю. Юнусова¹, Г. В. Кочнева²

*¹ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, г. Новосибирск, ² ФБУН Государственный
научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово*

Онколитические свойства ряда вирусов предполагается использовать для лечения онкологических заболеваний. Вирус осповакци-

* Научный руководитель — проф., д-р биол. наук Е. И. Рябчикова.

ны (BOB) обладает природной онкоселективностью, однако, в виро-терапии опухолей для предотвращения возможных осложнений необходимо использовать аттенуированные штаммы. Делеция двух генов — тимидинкиназы и вирусного фактора роста (VGF) — лиша-ет BOB возможности размножаться в нормальных клетках, тогда как способность вируса инфицировать и разрушать опухолевые клетки сохраняется. Онколитическую активность аттенуированных штам-мов можно усилить при помощи встройки генов дополнительных эффекторных молекул, среди которых особый интерес представляют белки-индукторы апоптоза. Апоптин — неструктурный белок виру-са анемии кур, избирательно вызывает апоптоз в опухолевых клет-ках. Ранее нами был установлен выраженный противоопухолевый эффект рекомбинантного штамма VVdGF-ApoS24/2 BOB с делеци-ей гена VGF и встройкой гена апоптоина на ксенографты карцино-мы A431, привитые мышам *nude*. В настоящей работе исследова-ли противоопухолевый эффект другого рекомбинантного штамма BOB, VVdGF-GFP2, с делецией двух генов (VGF и тимидинкиназы) и встройкой генов апоптоина и GFP.

Цель работы: изучить противоопухолевый эффект рекомбинант-ного штамма VVdGF-GFP2 BOB и его способность диссеминировать из опухоли, в которую его вводили, в отдаленный опухолевый узел (метастаз) и разрушать его ткань.

Для этого мышам *nude* подкожно в область правой и левой задних лап вводили суспензию клеток карциномы A431 (5×10^6 кл/мышь в 100 мкл 0,9% NaCl), через 10–12 дней у мышей формировались две опухоли размером 100–150 мм³. В опухоль над левой лапой вводили суспензию рекомбинантного BOB VVdGF-GFP2 (10^7 БОЕ/мышь в 100 мкл 0,9% NaCl). Забор опухолей для микроскопического ис-следования осуществляли каждые 2–3 суток в период с 4-х по 35-е сутки после введения вируса. Исследование осуществляли методами световой и электронной микроскопии и иммуногистохимии.

Светооптическое исследование установило, что введение реком-бинантного штамма VVdGF-GFP2 BOB в один из двух ксенографтов, приводит к деструкции обеих опухолей. Деструкция инфицирован-ной опухоли происходит постепенно, на парафиновых срезах опухо-

левых узлов в период наблюдения отмечается увеличение очагов деструкции и уменьшение участков визуально неповрежденной ткани. Разрушение опухолевой ткани в «метастазах» происходит более медленно. Полная деструкция ткани опухоли и «метастаза» регистрируется через 12 и 20 суток после инъекции вируса, соответственно. Разрушенная опухолевая ткань имеет признаки отека и небольшой лейкоцитарной инфильтрации. Маркером репродукции вируса в клетках опухоли является экспрессируемый вирусом белок апоптин. Иммуногистохимически апоптин выявлен в цитоплазме опухолевых клеток и опухоли, и «метастаза», причем отчетливая позитивная реакция отмечается в клетках опухоли через 4 суток после инъекции вируса, а в клетках «метастаза» — через 8 суток (рис. 1А).

Ультраструктурное исследование выявило избирательную репродукцию рекомбинантного штамма BOB в опухолевых клетках как опухоли, так и «метастаза» (рис. 1Б). Морфологических признаков репродукции BOB в клетках стромы опухолевых узлов не обнаружено (рис. 1В).

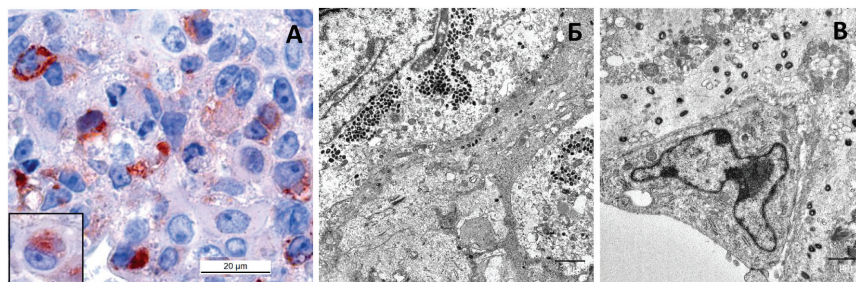


Рис. 1. Репродукция рекомбинантного штамма *VVdGF-GFP2 BOB* в опухолевых клетках карциномы A431. А — иммуногистохимическое выявление апоптина в клетках искусственного метастаза (8 суток после инъекции вируса), визуализация антигена хромогеном АЕС, докраска гематоксилином; Б — вирусные частицы в ткани искусственного метастаза, иссеченного через 12 суток; В — эндотелиоцит без признаков репродукции BOB, ультратонкие срезы

Таким образом, проведенное исследование показало, что рекомбинантный штамм BOB *VVdGF-GFP2*, экспрессирующий апоптин, способен разрушать клетки первичного опухолевого узла, мигрировать в отдаленный узел, разрушать его ткань, что указывает на анти-метастатический потенциал данного штамма.

DE NOVO СБОРКА ГЕНОМА МИКРООРГАНИЗМОВ ПОЛУЧЕННЫХ НА ПРИБОРЕ MISEQ ILLUMINA

Ж. А. Жаниязов, С. Т. Даугалиева, С. А. Айткельдиева, Е. А. Свирко

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК

Ключевые слова: NGS Секвенирование, *de novo*, Биоинформатическая обработка, геном.

Введение. Секвенирование геномов микроорганизмов является наиболее актуальным исследованием в молекулярной биологии. Наиболее распространенным на сегодняшний день является секвенирование первого поколения по методу Сэнгера, основанное на технологии капиллярного электрофореза. Однако возможности этого метода ограничиваются максимальной длиной прочтения около 1000 нуклеотидов, что не подходит для рутинного секвенирования протяженных регионов генома. Кроме того этой технологии присущи ограничения в пропуске, масштабировании, стоимости, скорости и в разрешениях, препятствующих ученым получать генетическую информацию. Для преодоления этих барьеров была разработана новая технология — секвенирование нового или второго поколения (next-generation sequencing — NGS). Её появлению способствовало развитие компьютерной индустрии, технологий изготовления микропроцессоров и цифровых носителей информации.

Материалы и методы. В работе было использовано 14 видов культур микроорганизмов.

№ п/п	Наименование микроорганизма	Длина генома п.н
1	<i>Pseudomonas azotifigens</i>	5,0
2	<i>Pseudomonas ztutzery</i>	4,57
3	<i>Tetrathlobacter mimigardefordensis</i> (<i>Advenella mimigardefordensis</i>)	4,7
4	<i>Bradyrizobium japonicum</i>	9,21
5	<i>Rizobium Leguminosarum</i>	5,06
6	<i>Bacillus Licheniformis</i>	4,3
7	<i>Bacillus coagulans</i>	3,07
8	<i>Propionibacterium</i> <i>freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	2,616
9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	1,845
10	<i>Bacillus subtilis</i>	5,0
11	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1,87
12	<i>Erwinia amylovora</i>	3,81
13	<i>Cellulomonas biazotea</i>	4,12
14	<i>Bacillus flavigena</i>	3,31

В работе наряду с классическими микробиологическими методами было проведено NGS-секвенирование на полногеномном секвенаторе нового поколения MiSeq (фирмы Illumina, США), который сочетает в одном инструменте: модуль для генерации кластеров, модуль для парноконцевого секвенирования и модуль для анализа и хранения полученных данных.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора PureLink® Genomic DNA Kits. Секвенирование полного генома бактерий осуществляли по технологии Illumina, основанной на массовом параллельном секвенировании миллионов одноцепочечных фрагментов ДНК с помощью флуоресцентно-меченых нуклеотидов.

В нашем исследовании было проведено парноконцевое секвенирование (Paired-end Sequencing), которое позволяет проводить секве-

нирование ДНК фрагмента с двух концов. В этом случае расстояние между каждой парой ридов известно, алгоритм выравнивания может использовать эту информацию для отображения ридов повторяющихся регионов более точно. Результатом этого является лучшее выравнивание ридов, особенно трудносеквенируемых повторяющихся регионов генома.

Биоинформатическую обработку проводили с использованием программ FastQC, Trimmomatic, Quast, Contiguator, GeneMarkS и Rast, ассемблеров SPAdes версии 3.0, Velvet.

Результаты исследований. В результате секвенирования были получены данные о полном геноме 14 видов микроорганизмов в формате .fastq, в связи с тем, что при полногеномном NGS секвенировании бактериального образца получается большой объем данных, представленных в виде ридов, биоинформатическая обработка была проведена на примере одного вида микроорганизма — *Bacillus Subtilis*. Оценивали полученные риды с помощью программы FastQC, в результате чего обнаружили проблемы в некоторых ридов. Для исправления проблем в ридов использовали программу Trimmomatic.

De novo сборку генома из очищенных ридов проводили с помощью двух разных ассемблеров: SPAdes версии 3.0 и Velvet. Для оценки результатов работы сборщиков использовали программу Quast, учитывая только контиги >500 bp.

Выравнивание полученных данных на референсный геном проводили в программе Contiguator, в качестве референсного генома взяли *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str. BAB-1, который скачали из базы NCBI.

На референсный геном было выравнено 47 контигов (4062364 п.н. из 4178896) и получена «псевдохромосома» — упорядоченный набор контигов, высокое число выравнивание указывает на высокое сходство с референсом и подтверждает принадлежность нашего штамма к этому виду микроорганизма. Также на наш геном не было выравнено 109 контигов, хотя число контигов много, но длина всех этих контигов составляет 116532 п.н., скорее всего не выравненные контиги принадлежат к плазмидной ДНК. Для аннотаций генов использовали программы GeneMarkS и Rast.

Обсуждение результатов. Секвенирование нового поколения на приборе MiSeq (Illumina) позволило получить данные о полном геноме 14 видов микроорганизмов за один запуск прибора. После секвенирования был получен набор прямых и обратных ридов. Показатель качества секвенирования составил $Q > 30$ (вероятность ошибки 1 из 1000, точность прочтения 99,9%), что говорит о хорошем качестве полученных данных. В результате NGS секвенирования на приборе MiSeq Illumina были получены данные о полном геноме 14 видов бактерий. Выравнивание полученных данных на референсный геном *Bacillus Subtillis* показало высокую схожесть контигов.

РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ ИНДЕКСА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРЕФЕРИЙНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Л. С. Адаменко ¹, М. А. Гуляева ¹, С. А. Зайцев ², А. М. Шестопалов ¹

¹ ФГБНУ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, ² ООО «Диатек»

Проблема онкологических заболеваний остается приоритетной для современного общества. Особая актуальность обусловлена высоким уровнем распространенности данной патологии среди населения, высокой летальностью, а также большими экономическими потерями. По данным Всемирной организации здравоохранения, каждый год от онкологических заболеваний в мире умирают более 7,5 млн. человек. Каждый год только в России выявляется около 500 тысяч онкобольных. Так, в Российской Федерации в 1998 году было зарегистрировано 440 721 новых онкобольных, а в начале 2009 года в онкологических диспансерах России состояло на учете 2 607 223 человек.

По данным Международного Агентства по Исследованию Рака Россия в 2012 году заняла 5-е место в мире по числу смертей онкологических больных. Высокий уровень смертности в России от онкологи-

ческих и сердечно-сосудистых заболеваний обусловлен поздним выявлением недугов. В 60% заболевание диагностируется в III–IV стадиях. На современном этапе развития медицины и здравоохранения особую актуальность приобретает вопрос внедрения инновационных технологий, направленных на своевременное определение заболевания. Выявляемость рака на ранних (I и II) стадиях – залог успешного лечения и сохранения высокого качества жизни у пациента.

Целью данной работы стала ранняя диагностика онкологических заболеваний, основанной на эффекте возрастания ИКЦ при развитии процесса неопластической трансформации.

Работа осуществлялась на клеточной линии рака молочной железы, способной экспрессировать опухолеспецифические антигены в крови пациента. Нами было исследовано 40 человек с заболеванием рак молочной железы, находящихся в стационаре отделения №3 Городской клинической больницы №1 г. Новосибирска. Анализ цитотоксического эффекта проводился с помощью оценки лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в кондиционной среде при совместном культивировании человеческой популяции клеток (ДК+МНК) и клеточной линии MCF-7. В результате проведенных исследований установлено, что группы условно здоровых доноров имеют достоверно меньший индекс цитотоксичности ($5,6 \pm 1,5$) по сравнению с группами больных РМЖ ($22,5 \pm 7$) на клеточной линии аденокарциномы молочной железы человека MCF7. При этом обнаружено, что индекс цитотоксичности МНК больных раком молочной железы (позитивных по HLA-A*02 и позитивных по Her2) по отношению к линии MCF-7 составляет 26 ± 4 , тогда как индекс цитотоксичности МНК больных раком молочной железы, позитивных по HLA-A*02 и негативных по Her2 равен $16,5 \pm 5$. Это указывает на значительный вклад в индекс цитотоксичности антигензависимой цитотоксичности, связанной с активацией гамма\дельта Т-лимфоцитов.

Таким образом, можно сделать вывод, что метод измерения ИКЦ позволяет надёжно различить больных раком молочной железы и условно-здоровых пациентов.

РАЗДЕЛ 2

ВИРУСОЛОГИЯ

**МОНИТОРИНГ ПАРАМИКСОВИРУСОВ ПТИЦ
В КАПЧАГАЙСКОМ ВОДОХРАНИЛИЩЕ**

П. Г. Алексюк, М. С. Алексюк, А. С. Турмагамбетова,
А. П. Богоявленский, В. Э. Березин

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

Вирусы рода *Avulovirus* являются причиной инфекций птиц, характеризующимися поражением всех внутренних органов и систем организма и способны вызывать крупные эпизоотии среди домашних и диких птиц. Представители этого рода вирусов являются одним из наиболее распространенных инфекционных агентов, циркулирующих практически во всех регионах мира. Вирусы способны вызывать массовую гибель птиц в птицеводческих хозяйствах, нанося значительный экономический ущерб. По современной классификации парамиксовирусы делятся на 12 серотипов. В Казахстане вирусы этого рода были впервые выделены в 1980 г. и с тех пор вспышки заболеваний, вызываемых парамиксовирусами птиц периодически возникают на территории Республики, принося значительные экономические потери птицеводству.

Быстрое развитие птицеводческой промышленности в Казахстане на индустриальной основе, а также наличие большого числа мелких фермерских хозяйств, требует постоянного контроля за

распространением подобных инфекций и проведения регулярных эпизоотических мероприятий.

Среди обширного числа методов диагностики парамиксовирусов в настоящее время применяются РГА, РТГА, РНГА и иммуноферментный анализ. Однако эти методы выявления либо недостаточно чувствительны, либо трудоемки в исполнении и требуют дорогостоящего оборудования и высококачественных реагентов. Поэтому, разработка надежных, простых в употреблении и высокочувствительных методов и тест-систем для диагностики парамиксовирусов птиц является весьма актуальной задачей современной вирусологии, имеющей не только теоретическое, но и большое практическое значение.

В наших исследованиях были проведены метагеномные исследования нуклеиновых кислот, выделенных из Капчагайского водохранилища. Водные образцы были выбраны по ряду причин, основными из которых является возможность эффективной концентрации образца методом ультрацентрифугирования и способность представителей данной группы сохранять инфекционность в водных образцах не менее 45 дней.

Пробы воды из Капчагайского водохранилища были отобраны в летнее время, что соответствовало среднему количеству микрофлоры водоема в среднесезонном значении. Отобранные пробы воды последовательно фильтровали через поликарбонатные фильтры (Millipore) с диаметром пор 1,2; 0,8; и 0,2 мкм с последующей концентрацией ультрацентрифугированием. Из полученных образцов выделили суммарную ДНК, которую затем анализировали методом полного секвенирования на ДНК секвенаторе “Illumina”. Риды собирали программой Edena, т.к. она позволяет варьировать минимальную длину общей части ридов, при которой они будут считаться пересекающимися. С целью нахождения наибольшего числа вирусов необходимое пересечение ридов было установлено в 35 нуклеотидов. Для поиска использовалась standalone версия blastnNCBI, 2.2.30. В качестве источника вирусных геномов использована NCBI nucleotide, содержащая 6079 полных геномов вирусов. Анализ полученных данных показал, что в Капчагайском водохра-

нилище обнаружен целый ряд фрагментов нуклеотидных последовательностей парамиксовирусов птиц. Филогенетический анализ последовательностей показал, что 64 % последовательностей соответствовало РМV1, а остальные РМV 2–12. При этом среди серотипов 2–12 с максимальной частотой встречались последовательности РМV9 и 4.

Таким образом, метагеномные исследования образцов, содержащих последовательности парамиксовирусов птиц способны привести к новым данным эволюционных превращений вирусов рода *Avulovirus*.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ АКТЮБИНСКОЙ ОБЛАСТИ В 2015 Г.

С. Б. Байсейіт, Т. И. Глебова, Г. В. Лукманова, Н. Г. Кливлеева,
М. Г. Шаменова

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

Грипп — это тяжелая вирусная инфекция, занимающая первое место среди других острых респираторных заболеваний. Гриппозная инфекция протекает с различной степенью тяжести и может сопровождаться смертностью, особенно часто регистрируемой среди маленьких детей и лиц пожилого возраста. По данным ВОЗ, ежегодно во всем мире гриппом заболевают 20–30 % детей и от 5 до 10 % взрослых, а от тяжелых осложнений, вызванных гриппозной инфекцией, умирают от 250 до 500 тыс. человек.

В эпидемический период 2015 г. в больницах и поликлиниках Актюбинской области от больных людей было собрано 39 носоглоточных смывов: 37 проб (94,9 %) — от пациентов с диагнозом ОРВИ, 2 пробы (5,1 %) — аденовирусная инфекция.

Первичный скрининг 39 биопроб на наличие антигена вируса гриппа типов А и В проведен с помощью РТ-ПЦР с использованием реагентов «АмплиСенс» производства ЦНИИ эпидемиологии (г. Москва). ПЦР диагностика клинических образцов показала, что генетический материал вирусов гриппа обнаружен в 10 смывах (25,6% от общего числа исследуемых проб). РНК вируса гриппа типа А выявлена в восьми биопробах (20,5%): А/Н1N1 в пяти смывах (12,8%), А/Н3N2 — в одной пробе (2,6%). В двух пробах (5,1%) обнаружена РНК одновременно обоих подтипов вируса гриппа А (Н1N1+Н3N2). Вирусы гриппа типа В выявлены также в двух образцах (5,1%). Эти данные указывают на циркуляцию в Актюбинской области вирусов гриппа смешанной этиологии.

В ходе первичного заражения и двух последовательных пассажей на куриных эмбрионах ПЦР положительного материала удалось выделить пять гемагглютинирующих агентов с титрами гемагглютинации 1:256–1:1024. Инфекционная активность выделенных изолятов составила 3,77–8,77 lg ЭИД₅₀/0,2.

Идентификацию изолятов проводили в реакции торможения гемагглютинирующей активности (РТГА) и в реакции ингибиции нейраминидазной активности (РИНА) согласно рекомендации ВОЗ. Гемагглютинирующая активность исследуемых изолятов в РТГА в титрах 1:20–1:320 подавлялась иммунными сыворотками к вирусам А/USA/1976/31 (Н1N1), А/Solomon Islands/03/06 (Н1N1) и А/California/04/09 (Н1N1)pdm. Нейраминидазная активность выделенных изолятов в титрах 1:100 подавлялась иммунной поликлональной сывороткой к вирусу гриппа А (Н1N1).

Таким образом, по результатам РТГА и РИНА изоляты 02/15, 03/15, 06/15, 18/15 и 20/15, выделенные от больных людей в г. Актобе, отнесены к вирусу гриппа А (Н1N1), что указывает на циркуляцию данного вируса гриппа на этой территории в 2015 г.

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ГРИППА ПОПУЛЯЦИИ СВИНЕЙ В 2014 Г. В КАЗАХСТАНЕ

М. Қ. Қалқожаева, Н. Т. Сактаганов,
Н. С. Онгарбаева, Н. Г. Кливлеева

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

Вирус гриппа является широко распространенным и значимым возбудителем респираторного заболевания у свиней. Эпизоотии среди животных имеют большое социальное значение в связи со способностью вируса к реассортации и возникновению штаммов, высокопатогенных для людей [Кузнецова Т. В. и др., 2009; Ишмухаметова Н. Г., 2013]. Эпизоотическая ситуация по гриппу особенно обострилась после заболевания и гибели людей от "нового" пандемического вируса гриппа свиней типа А, начавшегося в апреле 2009 г. в Мексике и распространившегося по всему миру и в Казахстане [Гендон, 2010; Икранбегийн Р., 2012].

С целью изоляции вируса гриппа свиней в 2014 г. в животноводческих хозяйствах Костанайской, Карагандинской, Восточно-Казахстанской и Алматинской областей от животных проведен сбор 192 носоглоточных смывов и 170 сывороток крови. Для исследования в РТ-ПЦР, иммуноферментном анализе на нитроцеллюлозной мембране (ИФА) и реакции иммунофлуоресценции (РИФ) использовали 107 биопроб (носоглоточные смывы).

В результате ПЦР диагностики выявлено 23 положительных образца (21,5%). Генетический материал вируса гриппа А/Н1N1 был обнаружен в 20 смывах, что составляет 18,7% от общего числа проб. РНК вируса подтипа А/Н3N2 выявлена лишь в трех материалах (2,8%). Таким образом, первичный скрининг носоглоточных смывов в РТ-ПЦР показал, что в популяции свиней в Казахстане циркулируют в основном вирусы гриппа А/Н1N1.

Данные ИФА на выявление антигенов вируса гриппа, показали наличие вируса в 16 образцах от общего числа проб (15%). В результате проведенной РИФ антигены вируса гриппа были обнаружены в 13 носоглоточных смывах (12,1%): к А/Н1N1 — в девяти (8,4%), к А/Н3N2 — в четырех (3,7%).

В результате первичного заражения куриных эмбрионов 192 пробами, собранными в 2014 г., было выделено восемь гемагглютинирующих агентов с титрами гемагглютинации 1:2 — 1:4. Однако в ходе последовательных пассажей три изолята утратили гемагглютинирующую активность, титры двух усть-каменогорских (20/14; 21/14) и трех алматинских (05/14; 06/14 и 10/14) вирусов удалось повысить до 1:16 — 1:256.

Серологический анализ проводили в реакции торможения гемагглютинирующей активности с использованием референсных штаммов: *A/swine/Iowa/15/30 (Hsw1N1)*, *A/California/07/09 (H1N1)v*, *A/Wisconsin/67/05 (H3N2)*.

Результаты серологических исследований 170 сывороток крови показали, что наибольшее количество положительных образцов к вирусу гриппа *A/Iowa/15/30 (Hsw1N1)* зарегистрировано в Костанайской (восемь проб, 4,7% от общего числа) и Карагандинской (семь материалов 4,1%) областях. Кроме того, в Карагандинской и Восточно-Казахстанской областях зарегистрированы случаи выявления антител к вирусам гриппа *A/California/07/09 (H1N1)* — 2 пробы (1,1%) и *A/Wisconsin/67/05 (H3N2)* — 3 сыворотки крови (1,8%).

Таким образом в результате скрининга биологических образцов (носоглоточные смывы и сыворотки крови) установлено, что на территории республики среди свиноголовья циркулируют разные штаммы вируса гриппа А, с явным преобладанием вируса гриппа А/Н1N1.

Постоянный надзор за гриппом в популяциях свиней играет важную роль в уменьшении вероятности межвидовой адаптации и распространения вирусов гриппа, в минимизации роли этих животных как источника возбудителя следующей пандемии.

СОЦИАЛЬНО-МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ

О. В. Шпилева

ФГБНУ «Томский НИИ онкологии», г. Томск

Рак шейки матки (РШМ) занимает второе место в структуре онкологических заболеваний у женщин. Ежегодно в России погибает от РШМ 6 тысяч женщин. Заболеваемость РШМ в России в 2011 г. составила 19,7 на 100 000 женского населения. [Давыдов М. И., Аксель Е. М. и соавт., 2011]. Отмечается негативная тенденция роста заболеваемости РШМ в молодом возрасте, а учитывая, что до 40 % больных РШМ выявляется в запущенных стадиях, одногодичная летальность составляет от 27–37%. [Чиссов В. И., 2009] Томская область относится к территории повышенного онкологического риска. Стандартизованный показатель РШМ в Томской области в 1,87 раз выше, чем по России и составляет $20,4^{0}_{0000}$ [Л. Ф. Писарева, И. Н. Одинцова, с соавт. 2012г.], а в структуре онкологической заболеваемости женского населения в возрасте 15–39 лет занимает 1-ое место. [Чуруксаева О. Н., Коломиец Л. А., Шпилева О. В. 2012г.].

Доказанная роль ВПЧ в развитие предопухолевых заболеваний и РШМ, определяет перспективность использования профилактических вакцин против папилломавирусной инфекции в качестве первичной профилактики.

Проведенные в НИИ онкологии эпидемиологические исследования показали, что средний возраст больных интраэпителиальными неоплазиями и раком шейки матки составляет $39,9 \pm 8,5$ лет, при этом 89,5 % обследуемых женщин HPV позитивны, что так же соответствует мировым тенденциям. Наибольший удельный вес среди обследуемых женщин составляют больные с предраком шейки матки (H-SIL) 45,9 %, средний возраст которых составляет до 30 лет.

Оценка удельного веса различных онкогенных типов HPV в зависимости от возраста представлена на рис. 1.

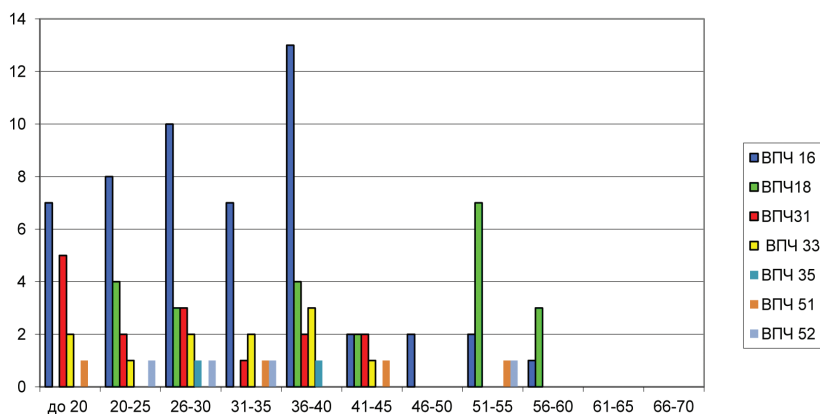


Рис. 1. Особенности распространения онкогенных типов ВПЧ в зависимости от возраста

Как видно из представленных данных, доминирующим подтипом ВПЧ в Томской области, так же как и в по мировым данным, является 16 подтип, который преобладает у молодых женщин в возрасте до 40 лет. Максимальный пик инфицированности ВПЧ 16 (74%) приходится на возрастную группу 36–40 лет, где отмечались и более высокие показатели заболеваемости РШМ. У больных старших возрастных групп (51–60 лет) развитие РШМ коррелировало в 25% с 18 типом ВПЧ, а в кдиническом плане, это ассоциируется с развитием аденокарциномы шейки матки, которая является менее благоприятным вариантом, имеет худшие отдаленные результаты и частое рецидивирование. Отмечена высокая частота встречаемости ВПЧ 31 типа, причем только у женщин до 45 лет, с максимальным пиком в возрастной группе до 20 лет (17%).

Выявленные региональные особенностей распространения ВПЧ, наряду с разработанными и зарегистрированными в настоящее время в России профилактическими вакцинами Гардасил и Церварикс, позволили разработать эффективную технологию, позволяющую осу-

шествовать первичную профилактику РШМ в и Томской области. К сожалению, данные профилактические вакцины не включены в обязательный календарь прививок в России. В рамках областных целевых программ «Неотложные мероприятия по совершенствованию онкологической помощи населению Томской области на 2008–2013 гг.», на территории Томской области, был реализован пилотный проект, на основе которого в 2010 году на базе НИИ онкологии был открыт кабинет иммунопрофилактики РШМ. Целевым контингентом для вакцинации были девушки 9–26 лет, с преимущественной возрастной когортой 11–13 лет, удельный вес которых составил 43 %. Всего, в рамках областной программы, было провакцинировано 627 девочек, введено 1653 дозы вакцин. Проведена оценка комплаентности дозовой схемы введения вакцины: трехкратно вакцина поставлена 414(66%) девочкам, двукратно 198 (31,6%) девочкам. Проводилась оценка безопасности по наиболее часто встречаемым реактогенным реакциям, удельный вес которых не превышал 9,6%, и в основном характеризовался головокружениями и болью в месте инъекции. В целом отмечена хорошая переносимость вакцинации.

Выявленные территориальные особенности по распространенности основных онкогенных типов ВПЧ инфекции в Томской области, при доказанной в профилактических вакцинах перекрестной эффективности в отношении генотипов ВПЧ, не входящих в состав вакцины, позволили обосновать целесообразность их использования в Томской области. Хороший профиль безопасности и реактогенности, позволил выявить социально-экономическую обоснованность, новой, эффективной, технологии первичной профилактики РШМ. При расчете социально-экономической обоснованности предлагаемой технологии, так же учитывался не только экономический ущерб от высокой смертности женщин от РШМ, но и затраты на лечение предраковой патологии, так как на каждые 10 случаев РШМ, приходится 25 случаев не выявленного предрака (CIN II-III). **Вакцинопрофилактика** может предотвратить рост заболеваемости РШМ в Томской области. На основе полученных данных, был произведен расчет ожидаемого ущерба от заболеваемости РШМ в Томской области, где учитывались не только стоимость диагностики и лечения предрака

шейки матки, но и убытки, связанные с временной постоянной нетрудоспособностью (выплаты социальных пособий, в т.ч. пенсии по инвалидности до достижения возраста 55 лет), а также размер ущерба, определяемый стоимостью недопроизведенного продукта за время недожития до пенсионного возраста. Расчеты показывают, что суммарный экономический ущерб, обусловленный ведением пациентов с РШМ, ежегодно, в зависимости от возрастных групп, может составить от 20 до 40 млн. руб. в год.

Таким образом, выявленные особенности распространения папилломавирусной инфекции в Томской области, и проведение первичной и вторичной профилактики РШМ, с учетом данных особенностей, позволит не только снизить заболеваемость раком шейки матки, но и сохранить репродуктивный, трудовой потенциал жительниц Томской области.

МЕТАГЕНОМИКА НОВЫХ ПАРАМИКСОВИРУСОВ В ВОДНЫХ ОБРАЗЦАХ КАПЧАГАЙСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

А. С. Турмагамбетова, М. С. Алексюк,
А. П. Богоявленский, В. Э. Березин

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

Вирусы, принадлежащие семейству Paramyxoviridae, хорошо известны из-за их способности вызывать разнообразные инфекционные заболевания человека (корь, свинка, респираторные и энцефалитные синдромы) и животных (чума крупного рогатого скота, болезнь Ньюкасла, пневмония мышей и обезьян). Опасность данного семейства вирусов была доказана тем, что за последние 20 лет обнаружены и охарактеризованы по крайней мере три новых инфекции, вызываемые вирусами Хендра, Нипах, Мененгле. Применение техники метагеномики при изучении вирусов летучих мышей

и мелких грызунов позволило выявить более 66 новых разновидностей этих вирусов.

Дальнейший мониторинг инфекционных агентов данного семейства, циркулирующих в популяциях животных и птиц, обусловлен рядом причин: (I) инфекционная — вспышки новых заболеваний связаны с представителями животного мира; (II) антропологическая — контакт между человеком и популяцией животных, в которой циркулирует вирус, приводит к повышению риска возникновения заболевания; (III) поиск инфекционного агента в образцах окружающей среды, позволяющий в разработке профилактических мероприятий по ограничению риска возникновения заболевания.

Поэтому мониторинг данной группы вирусов является одной из основных задач диагностической вирусологии. В наших исследованиях были секвенированы образцы нуклеиновых кислот, выделенных из крупнейшего в Казахстане искусственного водохранилища — озеро Капчагай. Пробы воды из Капчагайского водохранилища были отобраны в летнее время, что соответствовало среднему количеству микрофлоры водоема в среднесезонном значении. Отобранные пробы воды последовательно фильтровали через поликарбонатные фильтры (Millipore) с диаметром пор 1,2; 0,8; и 0,2 мкм с последующей концентрацией ультрацентрифугированием. Из полученных образцов выделили суммарную ДНК, которую затем анализировали методом полного секвенирования на ДНК секвенаторе “Illumina”. Риды собирали программой Edena, т.к. она позволяет варьировать минимальную длину общей части ридов, при которой они будут считаться пересекающимися. С целью нахождения наибольшего числа вирусов необходимое пересечение ридов было установлено в 35 нуклеотидов. Для поиска использовалась standalone версия blastnNCBI, 2.2.30. В качестве источника вирусных геномов использована NCBI nucleotide, содержащая 6079 полных геномов вирусов. Анализ полученных данных показал, что в Капчагайском водохранилище обнаружен целый ряд фрагментов нуклеотидных последовательностей парамиксовирусов крупного рогатого скота, летучих мышей, свиней, грызунов и птиц. Множественное выравнивание в базе данных полных геномов вирусов позволило вычле-

нить ряд последовательностей гена полимеразного белка вирусов летучих мышей. Филогенетический анализ гена полимеразного белка показал, что водные образцы Капчагайского водохранилища содержат фрагменты генов вирусов, родственных летучим мышам и мелким грызунам Африки и Индии. Полученные результаты способны стать предметом более детального изучения эволюционных превращений вирусов семейства Paramyxoviridae.

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОГЕНОМНОЙ ПЛАЗМИДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ КОПИЮ ГЕНОМА АДЕНОВИРУСА 6-ГО СЕРОТИПА, ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ИСПОЛЬЗОВА- НИЯ В РАЗРАБОТКЕ СРЕДСТВА ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ

Е. В. Демидова¹, М. В. Тарасова^{1,2}, С. В. Нетесов^{1,2}

¹ ФГАОУИО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», ² ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

По данным Росстата (<http://www.gks.ru>) в России ежегодно регистрируется около 526000 онкологических больных, и их число не уменьшается. Одним из новых подходов к лечению рака является использование онколитических вирусов.

Среди различных семейств вирусов, используемых в качестве онколитиков, одними из самых популярных являются аденовирусы в связи с несколькими особенностями их строения и жизненного цикла.

В подавляющем большинстве работ по конструированию онколитических аденовирусов основой для создания новых штаммов служит аденовирус 5-го серотипа в связи с высокой степенью изученности его генома и жизненного цикла, а также благодаря наличию коммерчески доступных наборов реагентов для генно-инженерных манипуляций с его геномом. Однако при проведении ряда клинических испытаний препаратов, созданных на основе аденовируса 5-го

серотипа, выяснились существенные ограничения в его использовании. Выявленные трудности можно преодолеть, используя аденовирус 6-го серотипа (Ad6). Он обладает меньшей распространенностью среди населения, а также большим временем элиминации при системном введении.

При создании эффективного вируса-онколита необходимо произвести изменения генома исходного вируса, с одной стороны, для усиления опухолевой специфичности, с другой — для усиления литических свойств. Первым фактом при создании модифицированного штамма является получение полногеномной копии ДНК вируса в составе плазмидного вектора.

Таким образом, цель данной работы — получение плазмиды, несущей копию полного генома аденовируса 6-го серотипа, для проведения генно-инженерных манипуляций с геномом с целью создания модифицированного аденовирусного штамма, обладающего повышенными онколитическими свойствами по сравнению с исходным Ad6.

Полногеномная плазида была получена путем гомологичной рекомбинации ДНК Ad6 с плазмидным вектором, содержащим начальный и конечный фрагменты генома Ad6 (pAdEnds) в клетках *E.coli* BJ5183.

Сначала в плазмиду pBR322 был встроен сайт рестрикции AsiSI, отсутствующий в геноме Ad6. Параллельно с этим начальный и конечный фрагменты генома Ad6 были амплифицированы таким образом, чтобы их «внешние» концы были фланкированы сайтами AsiSI для последующих встраивания/вырезания копии генома из плазмиды, а «внутренние» содержали сайт GsaI для сшивки друг с другом. Фрагменты имели длину 800–900 пн, что является оптимальным для прохождения последующей гомологичной рекомбинации.

Для получения плазмиды pAdEnds вектор pBRAd был линейаризован по сайту рестрикции AsiSI. Далее проводили лигазную сшивку полученного вектора и сшитых друг с другом начального и конечного фрагментов. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* штамма XL-Blue. Для подтверждения встройки были проведены рестрикционный анализ ДНК, выделенной из клонов, а также секвенирование.

В результате котрансформации клеток *E.coli* BJ5183 предварительно наработанной и очищенной ДНК Ad6 и линейаризованной по уникальному сайту плазмидой pAdEnds, была получена плаزمида pAd6, содержащая полный геном аденовируса 6-го серотипа.

Для подтверждения встройки ДНК Ad6 в плазмиду pAdEnds был проведен рестрикционный анализ ДНК, выделенной из клонов. На основании совпадения теоретической и экспериментальной картин расщепления установлено, что полученная плазмидная ДНК действительно соответствует заявленной плазмидой pAd6, содержащей полный геном аденовируса 6-го серотипа.

Копия ДНК Ad6, содержащаяся в составе плазмиды pAd6, была проверена на инфекционность путем трансфекции клеток линии Ad293 с липофектаминном. Наблюдалось хорошо выраженное цитопатическое действие, что подтверждает инфекционность копии ДНК Ad6, содержащейся в pAd6. Данный факт говорит об успешном клонировании копии ДНК Ad6 в составе плазмидного вектора с сохранением ее инфекционности и возможности использования данного вектора для создания различных онколитических штаммов Ad6.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ ТЯЖЕЛУЮ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ПАТОЛОГИЮ

А. В. Демина ¹, Г. Д. Акопов ², В. А. Терновой ¹,
А. О. Семенцова ¹, Е. В. Чаусов ¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово), ² МУЗ Новосибирский муниципальный родильный дом № 6

Введение: внутриутробная (врожденная) инфекция — инфекционное заболевание плода и новорожденного, при котором инфицирование плода различными возбудителями происходит в антенатальный или интранатальный периоды. Этиологическим фактором являются

как вирусы, бактерии, так и простейшие. Своевременное выявление возбудителя заболевания позволяет проводить этиотропную терапию и помогает избежать развитие тяжелых патологий органов и систем ребенка. Таким образом, актуальность проблемы своевременной и адекватной терапии врожденных инфекций обусловлена не только возможностью сокращения перинатальных потерь, но и сокращением неблагоприятных отдаленных последствий для здоровья детей.

Материалы и методы: исследованы сыворотки новорожденных, находившихся на лечении в реанимационном отделении Новосибирского муниципального родильного дома № 6 с 2010 г. по 2014 г. РНК/ДНК из клинических образцов выделяли с использованием набора для выделения РНК/ДНК из сыворотки или плазмы крови (НПФ Литех, Россия). кДНК была получена методом обратной транскрипции с использованием набора Реверта-L (ИЛС, Россия). Все образцы были исследованы методом ПЦР (ИЛС, Россия) на наличие следующих инфекций: *Candida spp.*, HSV I и II, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, *Toxopl. gondii*, HCV, HBV, HAV, HEV, *Trep.pallidum*, *Myc. tuberculosis*, Parvovirus B19, Rubella, *Chl. trachomatis*, *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.*, HPV (16, 31, 33, 35), Influenza A, Parainfluenza, *Trich. vaginalis*, *Neisseria spp.*, *Pneumocystis carinii*, а также исследованы на РНК Enterovirus (наборы для ПЦР диагностики ФБУН ГНЦББ «Вектор», Кольцово, Патент РФ №2459830, Патент РФ №2542968)).

Результаты и обсуждение: исследована 121 сыворотка от новорожденных детей, из них положительными на инфекции оказались 69 сывороток (57%). В положительных образцах выявлены следующие инфекции: CMV (30,5%); EBV (20,3%); HHV6 (11,6%); HSV I,II (10%); Enterovirus (10%); *Toxopl.gondii* (5,8%); *Mycoplasma spp.* (5,8%); *Candida spp.* (3%); HBV (1,5%); *Ureaplasma spp.* (1,5%) (табл. 1).

Таблица 1

п/п	Инфекции	Количество больных	Доля, %
1	CMV	21	30,5%
2	EBV	14	20,3%
3	HHV6	8	11,6%

Окончание табл. 1

4	HSV I,II	7	10 %
5	Enterovirus	7	10 %
6	Toxopl.gondii	4	5,8 %
7	Mycoplasma spp.	4	5,8 %
8	Candida spp.	2	3 %
9	HBV	1	1,5 %
10	Ureaplasma spp.	1	1,5 %

Наибольшее количество детей с инфекционной патологией были рождены с июля по сентябрь за весь период наблюдения с 2010 по 2014 гг. Самое низкое количество новорожденных с инфекционной патологией было отмечено в январе-феврале за тот же период. Герпесвирусные инфекции отмечались у новорожденных в течение всего года.

Выводы: наблюдение в течение 5 лет установило, что наиболее часто инфекционную перинатальную патологию новорожденных обуславливают герпесвирусы CMV, EBV и HHV6 (62,4 %). Благодаря немедленной диагностике детей им своевременно проводилась этиотропная терапия Ацикловиром, в связи с чем предотвращены неблагоприятные последствия для их здоровья.

ВАКЦИНОМИКА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

О. С. Ермилова, В. А. Белявская

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

Вакциномика — новое направление медико-биологических наук, изучающее влияние полиморфизма генов иммунного ответа на неоднородность приобретенного иммунитета и врожденных иммунных реакций на вакцинацию на индивидуальном и популяционном уровнях. Вакциномика изучает закономерности связей между эффектив-

ностью вакцинации и генотипическими особенностями индивида, привлекая для исследований арсенал самых совершенных методов, приемов, новых высокопроизводительных «-omics»-технологий: протеомики, транскриптомики, метаболомики и др.

Вакцина против натуральной оспы на основе осповакцины является наиболее эффективной из существующих вакцин, применение которой привело к эрадикации этого опаснейшего заболевания в результате внедрения программы глобальной иммунизации. Сегодня, несмотря на отсутствие очагов инфекции в природе, интерес к данному возбудителю и к разработке вакцин против ортопоксвирусных инфекций не ослабевает: США, Франция, Германия, Ю. Корея, проводят активную иммунизацию военных и гражданских лиц для проведения противоэпидемических мероприятий в случае возрождения вируса в результате актов биотерроризма или распространения в человеческой популяции близкородственных вирусов из природных резервуаров. Так же активно разрабатываются и испытываются вакцины 2–3 поколений, т.к. основным препятствием для применения вакцин 1-го поколения было наличие сопутствующих серьезных осложнений. Кроме того, сегодня ортопоксвирусы рассматриваются как перспективный объект для создания рекомбинантных вакцин против бешенства, гриппа, гепатита, туберкулеза, ВИЧ и в терапии онкологических заболеваний.

Для выяснения причин индивидуальных различий в эффективности и безопасности вакцинации зарубежными учеными проводятся ассоциативные исследования по оценке связи между полиморфизмом генов цитокинов.

Целью нашей работы является выявление взаимосвязи между полиморфизмом генов цитокинов, участвующих в формировании клеточного и гуморального иммунного ответов, и особенностями вакцинального процесса на сибирской популяции с использованием российской вакцины против натуральной оспы. Результатом такого изучения станет выявление механизмов, как именно генотипические особенности индивида реализуются в фенотипические в конкретных условиях окружающей среды.

В основе работы лежит проспективное изучение когорты лиц, иммунизированных против натуральной оспы по профессиональным

показаниям, постоянно проживающих на территории новосибирской области, с возможностью постоянного пополнения когорты. После получения согласия Этического комитета ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» была создана база данных вакцинированных лиц и банк биологических образцов сывороток и ДНК.

На основании ретроспективного анализа выделены группы, гетерогенные по течению вакцинального процесса, определены индивиды, предположительно являющиеся носителями аллелей генов, проявляющихся фенотипически крайними показателями в течение процесса вакцинации, и, в дальнейшем, показателями приобретенного гуморального и клеточного иммунитета. Изучение когорты вакцинированных выявило серьезные различия как в клиническом течении вакцинального процесса, так и в его результатах. Было показано, что в более чем 80% случаев первичная вакцинация против оспы протекает значительно тяжелее по сравнению с повторной вакцинацией сопровождается сильными вакцинальными реакциями (высокая лихорадка, подмышечный лимфаденит, выраженная местная гиперемия и отек и т. д.).

Оценка эффективности сформированного гуморально иммунного ответа по функциональной активности специфических антител в сыворотке крови вакцинированных лиц проведена методом нейтрализации на культуре клеток Vero. Анализ полученных данных подтверждает, что после первичной вакцинации уровень защитных антител значительно ниже, чем после регулярной вакцинации, а у отдельных лиц не достигает защитного уровня. Изучено также влияние ряда демографических факторов (пол, возраст первичной и повторных вакцинаций и т. д.) на показатели вакцинного процесса.

В настоящее время совместно с ФГБНУ «НИИ терапии и профилактической медицины» планируется провести скрининговое исследование значительного количества образцов сыворотки крови (более 10 000) из различных возрастных групп, в том числе лиц, вакцинированных в детстве, чтобы определить корреляты исключительной эффективности вакцины, связанной с пожизненной циркуляцией В- и Т- клеток памяти. Для проведения этой важной работы

необходимы скрининговые экспресс-методы, разработку которых мы планируем провести с учеными «Вектора» и ряда диагностических фирм.

Эффективность клеточного звена планируется определить с помощью метода ELISPOT с использованием инаktivированного вируса осповакцины и пептидных миметиков эпитопов для индукции синтеза цитокинов. Фенотипирование планируется провести методом ПЦР по конечной точке и в реальном времени генов цитокинов (TNF- α , ИЛ-10, ИЛ-18, ИЛР-18, CCR5 и др.).

Выявленные ассоциации помогут более полно представить картину взаимодействия многочисленных звеньев иммунитета и возможностей его регулирования, оценить генетическую неоднородность и различия сибирской популяции в сравнении с мировыми данными. Полученные данные позволят усовершенствовать вакцины против натуральной оспы, а также разработать на основе осповакцины более эффективные и безопасные вакцины нового поколения для профилактики социально-значимых заболеваний.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

Е. И. Филиппова¹, Г. И. Высочина², И. Е. Лобанова²,
Т. М. Шалдаева², Н. А. Мазуркова¹

¹ *ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»*, ² *ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН*

Вирусы гриппа А являются этиологическими агентами опасных инфекционных заболеваний человека и животных, способных протекать в форме обширных эпизоотий, эпидемий и пандемий с высокой смертностью.

Многие эксперты считают, что именно вирус гриппа птиц субтипа H5N1 является главным претендентом на роль нового пандемическо-

го штамма в связи с его взаимосвязью со штаммом H1N1, вызвавшим пандемию в 1918 году.

На сегодняшний день лишь две вирусные мишени используются для направленного действия химиопрепаратов. Это, во-первых, белок M2 вируса гриппа, играющий роль ионного канала в вирусной мембране, который блокирует препараты адамантанового ряда — римантадин и амантадин. Во-вторых, мишенью для лекарственного вмешательства является вирусная нейраминидаза — фермент, необходимый для почкования вирусных частиц и проявления инфекционных свойств вируса, против которой эффективны нейраминидазные ингибиторы занамивир, осельтамивир и перамивир. Обе группы соединений имеют свои недостатки. В отношении группы производных адамантана можно отметить сравнительно высокую токсичность, узкий спектр действия и быстрое формирование устойчивости к ним вируса. Для ингибиторов нейраминидазы также характерно формирование резистентности и высокая стоимость синтеза, что делает эти препараты менее доступными для широкого использования.

Поэтому в настоящее время особо актуальны исследования, направленные на расширение ассортимента противогриппозных препаратов. Доступным и дешевым сырьем для производства лечебных средств являются лекарственные растения, которые обладают широким спектром фармакологических свойств и низкой токсичностью.

Цель исследования — изучение противовирусных свойств растительных экстрактов в отношении вирусов гриппа на лабораторных животных.

Материалы и методы исследования. Для оценки противовирусной активности исследуемых образцов мы использовали высокопатогенный штамм вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и штамм вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

На противовирусную активность нами были исследованы этанольные экстракты монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), репейника волосистого

(*Agrimonia pilosa Ledeb*), полыни обыкновенной (*Artemisia vulgaris*) и дербенника иволистного (*Lythrum salicaria* L.). В качестве референс-препарата использовали Тамифлю (Ф. Хоффманн — Ля Рош Лтд., Швейцария).

Моделью экспериментальных животных служили аутбредные мыши ICR массой 14–16 г, полученные из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Мышам перорально вводили экстракты в объеме 200 мкл/гол. Суточная доза образцов составляла 26,6 мкг/г массы мыши.

Статистическую обработку проводили стандартными методами с помощью пакета прикладных компьютерных программ “Statistica 6,0”. Сравнение доли выживших мышей в инфицированных группах при введении экстрактов и контроле проводили по Chi-square (χ^2) критерию, а СПЖ животных — по U-критерию Манна-Уитни.

Результаты исследования. В культуре клеток MDCK был проведен первичный скрининг противовирусной активности 127 экстрактов из 101 вида растений, произрастающих на территории Западной Сибири, в отношении вирусов гриппа H3N2 и H5N1. Установлено, что этанольные экстракты, обладающие выраженной противогриппозной активностью *in vitro*, являются нетоксичными для лабораторных мышей и проявляют противовирусное действие в экспериментах *in vivo*.

Нами были выявлены критерии защиты животных от вирусной инфекции — выживаемость, коэффициент защиты и средняя продолжительность жизни (СПЖ) мышей в опыте и контроле после их заражения вирусами гриппа человека и птиц. В отношении вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) достоверное отличие доли выживаемости мышей в опыте относительно контроля отмечалось в группе инфицированных животных, которым вводили экстракт полыни обыкновенной. Экстракт, полученный на основе репейника волосистого, проявил защитный эффект по всем трем показателям, однако этот эффект был ниже такового для коммерческого противогриппозного препарата Тамифлю® (табл. 1).

Таблица 1

Противовирусная активность этанольных экстрактов
высших растений в экспериментах на мышах,
инфицированных 10 ЛД₅₀ вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2)
по лечебно-профилактической схеме

Группы мышей, получавших препараты	Показатели выживаемости мышей, зараженных 10 ЛД ₅₀ вируса гриппа (n=10)		
	Количество и (%) выживших	Коэффициент защиты (КЗ)	СПЖ (сут) M ± Sm
Монарда дудчатая	2 (20 %)	20 %	8,6 ± 4,0
Шалфей лекарственный	0 (0 %)	0 %	6,4 ± 0,8
Репейничек волосистый	4 (40 %)*	40 %	10,6 ± 3,0*
Дербенник иволистный	0 (0 %)	0 %	7,4 ± 1,6
Полынь обыкновенная	4 (40 %)*	40 %	10,0 ± 5,2
Тамифлю	6 (60 %)*	60 %	11,4 ± 3,4*
Контроль (без препарата)	0 (0 %)	-	6,2 ± 1,6

Примечание: коэффициент защиты (КЗ)= % гибели в контроле — % гибели в опыте; * — отличие от контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; & — отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,006$; СПЖ рассчитывали, принимая за максимальный срок жизни выживших животных 16 сут; M — среднее, Sm — стандартное отклонение; n — число животных.

В отношении вируса гриппа субтипа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) достоверный защитный эффект проявили все растительные экстракты. При этом экстракт, полученный на основе полыни обыкновенной, обладал наибольшим противовирусным эффектом, который был сравним активностью противогриппозного препарата Тамифлю® (табл. 2).

Таблица 2

Противовирусная активность этанольных экстрактов высших растений в экспериментах на мышах, инфицированных 10 ЛД₅₀ вируса гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) по лечебно-профилактической схеме

Группы мышей, получавших препараты	Показатели выживаемости мышей, зараженных 10 ЛД ₅₀ вируса гриппа		
	Количество и (%) выживших	Коэффициент защиты (КЗ)	СПЖ (сут) М ± Sm
Монарда дудчатая n = 16	8 (50%)*	50 %	12,4 ± 3,9 ^{&}
Шалфей лекарственный n = 16	8 (50%)*	50 %	12,4 ± 3,8 ^{&}
Репейник волосистый n = 10	4 (40%)*	40 %	13,0 ± 3,1 ^{&}
Полынь обыкновенная n = 10	6 (60%)*	60 %	13,2 ± 3,7 ^{&}
Дербенник иволистный n = 10	4 (40%)*	40 %	12,8 ± 3,1 ^{&}
Тамифлю n = 10	6 (60%)*	60 %	13,2 ± 3,6 ^{&}
Контроль (без препарата) n = 10	0 (0%)	-	8,0 ± 1,3

Примечание: коэффициент защиты (КЗ) = % гибели в контроле — % гибели в опыте; * — отличие от контроля по критерию χ^2 при $p \leq 0,05$; [&] — отличие от контроля по U-критерию Манна-Уитни при $p < 0,006$; СПЖ рассчитывали, принимая за максимальный срок жизни выживших животных 16 сут; М — среднее, Sm — стандартное отклонение; n — число животных.

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что разработка препаратов на основе сырья из лекарственных растений может оказаться весьма перспективной для борьбы с гриппозной инфекцией.

АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ: СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ РАСПРОСТРАНЕНИЯ В РФ И СТРАНАХ ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ

А. С. Иголкин

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Введение

Африканская чума свиней (болезнь Монтгомери, восточно-африканская лихорадка, *Pestis africana suum*, АЧС) — природно-очаговая вирусная болезнь домашних свиней и кабанов, характеризующаяся лихорадкой, геморрагическим диатезом, дистрофическими, воспалительными и некротическими изменениями внутренних органов. В соответствии с современной международной классификацией, она включена в список Всемирной организации здравоохранения животных (МЭБ) в категорию «болезни и инфекции свиней», которые подлежат обязательной декларации. Высокая летальность, отсутствие средств специфической профилактики и необходимость массового уничтожения заболевших и контактировавших с ними свиней представляет АЧС, как одну из самых экономически значимых и опасных инфекций. Возбудителем АЧС является сложноустроенный ДНК-содержащий арбовирус семейства *Asfarviridae*. В настоящее время учеными идентифицировано 22 генотипа вируса. Штаммы возбудителя различаются по вирулентности (от высоковирулентных до авирулентных), по серологическим и иммунологическим свойствам. Вирус достаточно устойчив во внешней среде при широком диапазоне температур. Восприимчивыми животными являются домашние свиньи и кабаны. Для человека инфекция не опасна, однако во многих случаях именно антропогенный фактор является основным в распространении АЧС. В случае переболевания животные остаются практически пожизненными вирусоносителями. До XX века традиционной стационарно неблагополучной зоной по АЧС являлись многочисленные страны африканского

континента. Однако регистрация в 2007 году инфекции в Грузии, масштабное распространение в РФ и появление очагов в странах Восточной Европы в очередной раз доказали возможности заноса вируса АЧС в любую страну мира.

Результаты исследований

На территории Африки стационарно выделяют штаммы вируса АЧС различных генотипов. В ряде стран, расположенных вдоль атлантического побережья континента, циркулирует возбудитель I генотипа, который в XX-м веке стал причиной вспышек АЧС в странах Европы и Латинской Америки: Португалия, Испания (1960 г.), Франция (1964 г.), Бельгия, Голландия (1965 г.), Италия, Сардиния (1967 г.), Куба (1971 г., 1980 г.), Доминиканская Республика, Гаити, Бразилия (1978 г.).

К концу XX века (1998 г.) АЧС, обусловленная вирусом II генотипа, была занесена на Мадагаскар, где широко распространилась среди домашних и диких свиней. В 2007 г. она была обнаружена уже в Грузии, а затем быстро распространилась в Армению, Абхазию, Азербайджан, Южную Осетию и Россию.

В РФ впервые вирус АЧС был выделен от обнаруженных на территории Чеченской Республики на границе с Грузией в трупах павших кабанов разного возраста в ноябре 2007 г. Уже летом и осенью 2008 г. зарегистрированы очаги АЧС в популяции домашних свиней в Северной Осетии, Ингушетии, а также среди кабанов в Р. Кабардино-Балкарии, на территории Ставропольского и Краснодарского краев. В июле 2008 г. установлен первый «выносной» случай АЧС в Оренбургскую область, граничащую с Республикой Казахстан.

Распространение АЧС по регионам Северо-Кавказского и Южного федеральных округов продолжилось в 2009–2010 гг. Выявлены вспышки АЧС среди домашних свиней и кабанов в Волгоградской и Астраханской областях. Отмечен вынос АЧС на территорию Ленинградской области. В 2011–2012 гг. эпизоотическая ситуация по АЧС в стране ухудшилась. Зона распространения болезни охватила территорию 5 федеральных округов: Южного, Северо-Кавказского, Центрального, Приволжского и Северо-Западного. В течение 2007–2014 гг. неблагополучными по АЧС в России оказались 39 субъектов.

За 8 месяцев 2015 г. зарегистрировано 57 вспышек АЧС, в том числе 25 среди кабанов в Волгоградской, Калужской, Орловской, Ярославской, Саратовской, Владимирской, Рязанской областях и Р. Кабардино-Балкарье и 25 среди домашних свиней в Брянской, Волгоградской, Курской, Московской, Орловской, Смоленской, Саратовской, Рязанской областях и Краснодарском крае.

Вся информация, начиная с первого случая обнаружения вируса АЧС на территории Российской Федерации, аналитические обзоры, карты, прогнозы распространения, обсуждения складывающейся ситуации, представлена в открытом доступе на официальном сайте Россельхознадзора.

В 2012 г. АЧС официально установлена на территории Украины, в 2013 г. в Республике Беларусь, в 2014 г. в Польше, Литве, Латвии и Эстонии.

Как правило, при заносе инфекции на благополучную территорию отмечается медленное распространение АЧС («ползучая инфекция»). Однако в некоторых случаях возможно и скачкообразное распространение вследствие нарушения людьми ветеринарно-санитарных требований при ведении хозяйственной деятельности, нелегального перемещения инфицированной продукции свиноводства и свиней на большие расстояния (распространение вдоль транспортных магистралей, вокруг воздушных и транспортных узлов). В ряде случаев от первых фактов гибели животных, остающихся вне подозрения, до массового падежа проходит 1,5–3 месяца.

К распространению инфекции в РФ привели ряд факторов:

- недооценка опасности АЧС хозяйствующими субъектами и населением;
- нарушение ветеринарно-санитарных правил;
- незаконный оборот животных и продукции свиноводства;
- скармливание свиньям необезвреженных пищевых отходов;
- сокрытие фактов заболевания и гибели животных;
- низкий уровень биологической защиты свиноводческих объектов от заноса возбудителя АЧС;
- несоблюдение правил по утилизации биологических отходов;
- недостаточность правовой базы для решения перечисленных проблем.

Разработанный МСХ РФ «Актуализированный план мероприятий по предупреждению распространения и ликвидации вируса африканской чумы свиней на территории Российской Федерации» (утв. 25 октября 2012 г.) включает меры, подлежащие реализации различными структурами на всей территории РФ.

Ситуация по АЧС в странах Европейского Союза

За прошедшее чуть более 1,5 года с момента первого официально нотифицированного случая АЧС в начале 2014 года в Европе зарегистрировано более 700 очагов АЧС, что сопоставимо с количеством очагов за 8 лет эпизоотического неблагополучия России. Сегодня в прибалтийских странах (Эстония, Латвия, Литва) сформировалась стационарно инфицированная по АЧС зона.

Несмотря на повсеместную декларацию предпринимаемых действий на различных официальных и неофициальных уровнях, включающих: контроль над природным резервуаром (дикие кабаны), стемпинг аут, карантин, контроль передвижения восприимчивого поголовья и зонирование, в странах восточной Европы практически ежедневно регистрируют возникновение новых очагов инфекции не только среди кабанов, но и в фермерских и коммерческих хозяйствах. Это указывает на укоренение заболевания и повышения риска к распространению на пока благополучные территории (Чехия, Германия, Австрия).

Особую озабоченность РФ вызывают очаги инфекции возникающие в 2015 году в Латвии и Эстонии. Проведенный анализ российскими учеными показал высокий риск реинтродукции вируса в Псковскую и Ленинградскую области РФ, где расположен ряд крупных свиноводческих предприятий. Обширное распространение вируса в Литве угрожает благополучной (на 12.08.2015 г.) Калининградской области.

В Литве заболевание первоначально установлено 24 января 2014 года. За весь период наблюдения на 19.08.2015 г. установлено 116 очагов, из них в этом году сообщено о 68 вспышках АЧС в популяции дикого кабана и домашних свиней. В июле 2014 г вспышка инфекции обнаружена на ферме, принадлежащей компании Idavang в Игналинском районе. В ходе проведения ликвидационных мероприятий уничтожено более 20000 голов свиней.

В Польше заболевание впервые установлено феврале 2014 года. За весь период наблюдения зафиксировано 78 вспышки инфекции. За 2015 год — 46 вспышки, из которых 45 в популяции дикого кабана на территории Подлядского воеводства.

В Латвии согласно данным МЭБ первый случай установлен 16 июля 2014 года, когда было сообщено о 3 павших диких кабанах найденных возле границы с Беларусью, в этот же день АЧС установлена у 3 домашних свиней из личного подсобного хозяйства. За весь период наблюдения сообщается о 532 очагах заболевания. 38 вспышек болезни произошли среди домашних животных, 494 — среди диких кабанов. В 2015 году выявлены случаи заболевания домашних свиней АЧС: в Даугавпилсском (3 очага), Циблском (1 очаг) и Алойском (2 очага) краях.

Официально Эстония о первой вспышке заболевания впервые сообщило 2 сентября 2014 года, когда был обнаружен труп дикого кабана. Всего за этот период страной нотифицировано 193 очага АЧС. Болезнь выявлена на территории 11 уездов (IDA-VIRU, JÄRVA, JÕGEVA, LÄÄNE-VIRU, PÄRNU, PÕLVA, RAPLA, TARTU, VALGA, VILJANDI, VÕRU). В 2015 году случаи заболевания свиней АЧС на коммерческих фермах отмечены в уездах: VILJANDI, JÄRVA, JÕGEVA, TARTU, VÕRU (8 очагов) и в личных подсобных хозяйствах на территории уездов VALGA, VILJANDI и LÄÄNE-VIRU (4 очага). Остальные 165 случаев заболевания диагностированы у диких кабанов.

По официальным данным ФАО, численность кабанов на территории Европы достигает 4,5 млн. особей. Высокая плотность поголовья этих животных на территории континентальной Европы не только усложняет контроль и искоренение инфекции, а также являться вектором прогрессии географического распространения АЧС как в западном, так и в восточном направлении.

Не стоит оставлять без внимания и резко ухудшившуюся в 2015 ситуацию по АЧС на **Украине**.

По данным МЭБ за период с 30.07.2012 г. по 21.07.2015 г. на территории Украины выявлено 28 очагов АЧС. Из них 19 — среди домашних животных и 9 — среди диких. В конце июля этого года инфекция поразила самый крупный свиноводческий комплекс Украины ООО «Калита», на котором уничтожено более 60 тыс. голов свиней.

Сложная на сегодняшний день экономическая ситуация в стране существенно осложняет контроль за выполнением противоэпизоотических мероприятий при возникновении очагов инфекции, не может гарантировать контроль и не распространения в западные регионы страны и далее на территорию балканских стран, где популяция дикого кабана многочисленна.

Заключение

По мнению российских ученых и компетентных служб одной из основных проблем распространения АЧС в странах Европы является использование ветеринарными службами стран-членов ЕС «мягких» подходов к купированию очагов инфекции, проведению ликвидационных и профилактических мероприятий, включающих регулирование численности дикого кабана, тем самым создавая достаточную буферную зону между благополучными и неблагополучными регионами.

ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОСЛЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С СУБСТРАТОМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

О. В. Иунихина¹, Н. В. Рева²

*¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени Г. П. Сомова», ² Дальневосточный
федеральный университет*

Хантавирусы (род Hantavirus, семейство Bunyaviridae) являются возбудителями зоонозных, природно-очаговых инфекций, таких как хантавирусный легочный синдром (ХЛС) в Новом Свете и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) на евразийском континенте.

Самой многочисленной группой, среди инфицированных хантавирусами, мелких млекопитающих являются мышевидные грызуны. Попадая в окружающую среду с экскретами природных хозяев хантавирус способен сохраняться в течение определенного времени, не

теряя инфекционности, что определяет воздушно-пылевой путь заражения людей. Так, например, вирус Ruutala сохранял свои биологические свойства при комнатной температуре в подстилке, зараженной выделениями грызунов в течении 2-х недель [1]. В отношении сохранения инфекционности вируса Hantaan, при экспериментальном исследовании во влажных условиях, отмечалась зависимость от температуры: более высокая температура окружающей среды снижала выживаемость хантавируса. Вирус сохранял инфекционность при +4°C в течение 96 дней, при +20°C этот период сокращался до 9 дней [2].

Вирусы, в том числе хантавирусы, находящиеся во внешней среде, вне чувствительного организма подвергаются воздействию комплекса абиотических и биотических факторов, которые могут изменять их биологические свойства.

В ходе предыдущих исследований была установлена способность хантавируса адсорбироваться на разнообразных субстратах внешней среды с последующей десорбцией белоксодержащим раствором нейтральной pH [3].

Цель работы — показать изменение биологических свойств хантавируса после взаимодействия с субстратами внешней среды при экспериментальной хантавирусной инфекции *in vivo*.

Материалы и методы. В качестве модели экспериментальной хантавирусной инфекции использовали беспородных белых мышей в возрасте 24–48 ч. Опытную группу животных заражали *in cer* штаммом Аа 6034379-95 вируса Hantaan, **геновариант Far East**, полученного после адсорбции хантавируса на луговой почве и инкубации при 4°C в течении 7 дней с последующей десорбцией белоксодержащим раствором (5 % БСА на ФСБ pH 7,2). Полученный элюат до заражения животных пассировали в течение 2 пассажей на культуре клеток Vero E6 для накопления инфекционного вируса. Контрольную группу животных заражали вирусосодержащей жидкостью нативного Аа 6034379-95. Дозы при заражении и титр вирусов были одинаковы (0,001 мл и 4,4 ФОЕ/мл соответственно).

Результаты

В результате исследования было показано, что в контрольной группе животных к с 17 дня наблюдались первые признаки экспе-

риментальной хантавирусной инфекции, характерные для данной модели: вялость, взъерошенность шерсти, потеря в массе, атаксия. Затем присоединялись парезы задних лап, переходящие в параличи, агония. Смертность среди животных данной группы составила 100 % на 20 сутки после инфицирования. В мозге погибших животных обнаруживался хантавирус в титре 1-2 lg ФОЕ/мл. **Данные эксперимента** соответствовали наблюдениям других исследователей [4]. В опытной группе (1 пассаж) (хантавирус после адсорбции) все животные оставались клинически здоровы до 40 дня наблюдения, однако у сосунков мышей, выведенных из опыта на 20 день в мозге также обнаруживался хантавирус в титре 1-2 lg ФОЕ/мл. При последовательном заражении этой суспензией мозга другой группы неинфицированных новорожденных белых мышей (**in seg, 2 пассаж**) **животные** оставались клинически здоровы до 40 дня наблюдения. Аналогичная картина наблюдалась при 3 пассаже. Инфекционный хантавирус в мозге определялся только на 20 день у животных на втором пассаже и отсутствовал на всем протяжении эксперимента в последующем.

Также установлено, что, несмотря на снижение вирулентности до полного ее отсутствия, у хантавируса после взаимодействия с субстратом внешней среды, на модели внутримозгового заражения новорожденных белых мышей, способность вызывать выработку специфических антител сохранялась на протяжении двух пассажей, хотя и отмечено более позднее антителообразование. Так на первом пассаже (на 30 день наблюдения среднее значение титра анти-хантавирусных антител в крови составило 1:56, на 40- 1:60), по сравнению с контролем (к 17–20 — 1:22,8). На втором пассаже анти-хантавирусные антитела обнаруживались только на 20 день после инфицирования у 71,4 % животных, среднее значение титра составило 11,4, на третьем пассаже отсутствовали на всем протяжении эксперимента.

Таким образом, обнаружено снижение вирулентности хантавируса варианта Far East после взаимодействия с субстратами внешней среды до полной ее потери при пассивировании на модели внутримозгового заражения белых мышей в возрасте 24–48 ч. при сохранении способности вызывать выработку специфических антител на протяжении двух пассажей. Полученные результаты могут свидетельствовать о не-

гативном воздействии некоторых факторов окружающей среде, способствующих селекции высоко- и низковирулентных клонов вирусной популяции, что может лежать в основе цикличности эпизоотического и эпидемического процессов при хантавирусной инфекции.

Список литературы

1. Kallio E. R., Klingstrom J., Gustafsson E., Manni T., Vaheri A., Henttonen H., et al. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment // J. Gen. Virol. 2006. Vol. 87. P. 2127–2134.
2. Hardestam J., Simon M., Hedlund K. O., Vaheri A., Klingstrom J., Lundkvist A. Ex vivo stability of the rodent-borne Hantaan virus in comparison to that of arthropod-borne members of the Bunyaviridae family // App. and environmental microbial. 2007. Vol. 73, No. 8. P. 2547–2551.
3. Иунихина О. В. Вирусолого-эпизотологическое обоснование воздушнопылевого пути заражения хантавирусом: автореф. дис. канд. мед. наук Владивосток 2010.
4. Компанец Г. Г. Биологические свойства хантавирусов, циркулирующих в Приморском крае // Тихоокеанский медицинский журнал 2008. № 2(32). С. 61–64.

ISOLATION OF INFLUENZA A VIRUSES FROM WILD BIRDS IN CENTRAL KAZAKHSTAN IN 2004–2013

Ye. T. Kasymbekov, K. Kh. Zhumatov, M. Kh. Sayatov,
A. I. Kydyrmanov, K. O. Karamendin, S. E. Asanova, K. D. Daulbayeva
*Institute of Microbiology and Virology, 103 Bogenbai batyr St. 050010,
Almaty, Kazakhstan*

Background. Wild birds populations are natural niche and gene pool of all varieties of influenza A viruses. Influenza A/H5 viruses represent highly pathogenic group of agents while H3 subtype viruses are the most common in *Orthomyxoviridae* family, and infect humans, birds, and some mammals. This makes Kazakhstani isolates of these pathogens subject interesting for further research.

Methods. Virus isolation was performed by inoculating each sample of the material in the allantoic cavity of 10–11-day-old chick embryos. To establish relatedness of hemagglutinating agents to influenza A viruses RT-PCR was used with primers to the M gene. Viral RNA was extracted using QIAamp Viral RNA Mini Kit. Reverse transcription was performed with AMV reverse transcriptase with primers Uni 12 (agcaaaagcagg). Amplification of cDNA was performed using primers recommended for sequencing the genome segments of influenza A viruses. After purification, the PCR products were sequenced on an ABI 3730xl DNA analyser (Applied Biosystems).

Phylogenetic trees were generated using the Neighbour-joining method, and the Tamura-Nei model with 500 bootstrap replicates in MEGA 5.0 software.

Results. During the period of 2004–2013 in Central Kazakhstan 804 probes from 784 wild waterfowls belonging to eight families of four orders were collected. 32 influenza A viruses were isolated from cloacal swabs, seven were identified as H3N6 viruses, 14 as H3N8, two as H4N6, and nine as N5N3 viruses. Viruses were allocated mainly from representatives of *Anseriformes*, except for two which were derived from *Charadriiformes*.

Members of H3 subtype were isolated from mallard (*Anas platyrhynchos*), pintail (*Anas acuta*), garganey (*Anas querquedula*), green-winged teal (*Anas crecca*), common tern (*Sterna hirundo*), graylag goose (*Anser anser*), common shelduck (*Tadorna tadorna*), common gull (*Larus canus*), red-crested pochard (*Netta rufina*) and eurasian wigeon (*Anas penelope*).

H4N6 viruses were allocated from ruddy shelduck (*Tadorna ferruginea*) and green-winged teal.

In 2009 nine viruses with H5N3 antigenic composition were isolated from wild geese (graylag goose, greater white-fronted goose — *Anser albifrons*, lesser white-fronted goose — *Anser erythropus*). Sequencing of HA, M, NP and NS genes of this viruses showed their phylogenetic relationship with Western strains of this subtype.

Conclusions. Wild avifauna in Central Kazakhstan represents one of the centers of dissemination in Eurasia of influenza A subtype H3, H4 and H5 viruses, belonging to various phylogenetic clusters.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИОФАГА AP22 МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Д. В. Корнеев¹, А. В. Попова²

¹ *ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»*, ² *ФБУН Государственный научный
центр прикладной микробиологии*

Атомно-силовой микроскоп позволяет осуществлять манипуляцию одиночными наноразмерными частицами и исследовать их механические характеристики. Данный метод называется атомно-силовой спектроскопией и широко применяется в исследованиях различных биологических объектов.

Бактериофаг AP22 принадлежит к семейству *Myoviridae*, имеет икосаэдрическую головку диаметром около 65 нм и сокращающийся хвостовой отросток длиной 85–90 нм. Аппарат адсорбции данного бактериофага состоит из базальной пластинки диаметром 22–23 нм и хвостовых фибрилл.

Для проведения измерений одиночный вирион необходимо зафиксировать на острие зонда атомно-силового микроскопа. Использовали зонды CSG01/Au производства NT-MDT (Россия), изготовленные из кремния и покрытые слоем золота, который обеспечивает проводимость и позволяет использовать их в качестве электродов. Для достижения селективности при сорбции вирионов использовали эффект положительного диэлектрофореза в 0,3 М растворе сахарозы при частоте электрического поля 1.75 МГц.

После силовых измерений зонды визуализировали методом просвечивающей электронной микроскопии (JEM 1400, Jeol, Япония) с использованием специального держателя чипа. Учитывались результаты лишь тех измерений, после которых на острие зонда удавалось обнаружить фрагменты вириона.

В результате обработки полученного массива силовых кривых при помощи программного пакета ForceReader собственной разработки, были получены следующие величины, характеризующие взаимо-

действие бактериофага AP22 с поверхностью модельной микробной пленки:

Амплитуда сокращения хвостового отростка: 34 ± 8 нм

Пик амплитуды силы при отрыве вириона от поверхности: 18 ± 6 нН.

Впервые осуществлено прямое механическое измерение амплитуды сокращения хвостового отростка бактериофага.

Список литературы

1. D. Alsteens, E. Pesavento, G. Chevart, et al. / Controlled manipulation of bacteriophages using single-virus force spectroscopy, ACS Nano, 2009, 3(10), pp. 3063–3068.

2. E. V. Dubrovin, A. V. Popova, S. V. Kraevskiy et al., Atomic force microscopy analysis of the acinetobacter baumannii bacteriophage AP22 lytic cycle / PLOS ONE, 2012, 7(10), pp. 1–9.

3. H. A. Pohl / Dielectrophoresis, Cambridge University Press, Cambridge, 1978.

4. Корнеев Д. В. / Наука из первых рук, 2014, Т. 57–58, № 3–4, С. 182–187.

ВИРУСИНГИБИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКА *CETRARIA ISLANDICA* В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А

Е. В. Макаревич¹, М. О. Скарнович¹,
Н. В. Седельникова², Н. А. Мазуркова¹

¹ ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор», ² ФГБУН Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН

Вирус гриппа является единственным вирусом, способным вызвать пандемию в современном мире и поражающий в период сезонных вспышек эпидемий до 20% населения планеты. В дополнение к вакцинации, как основной стратегии борьбы с гриппом, ВОЗ реко-

мендовано применение противовирусных этиотропных химиопрепаратов, подавляющих размножение вируса и направленных на определенную вирус специфическую мишень в его цикле. На сегодняшний день в мире для лечения и профилактики гриппа применяется две группы таких препаратов, отличающихся по мишеням и механизму действия в жизненном цикле вируса гриппа: это препараты адамантанового ряда и ингибиторы нейраминидазы.

В последнее десятилетие в мире наблюдается повышенный интерес к препаратам, в том числе и противовирусным, на основе соединений природного происхождения, что обусловлено низкой токсичностью таких лекарственных средств.

Одним из перспективных видов растительного сырья для разработки новых лекарственных препаратов являются лишайники. Лишайники содержат вещества, которые не встречаются в других растениях: лишайниковые кислоты, лишенин, изолишенин, эвернин и другие, которые обладают выраженной антимикробной активностью. Среди огромного разнообразия лишайников особый интерес представляет Цетрария исландская, как наиболее сложный в химическом отношении вид, на основе которого созданы антибиотические препараты.

Целью данной работы было изучение противовирусных свойств и механизма действия водного и этанольного экстрактов Цетрарии исландской в экспериментах *in vitro*. **Нами были исследованы токсические и противовирусные свойства водного и этанольного экстрактов лишайника *Cetraria islandica* в культуре клеток MDCK.** В работе были использованы вирус гриппа птиц — штамм A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и вирус гриппа человека — штамм A/Aichi/2/68 (H3N2). Штаммы вируса гриппа и культура клеток были получены из коллекций ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Установлено, что растительные экстракты малотоксичны для культуры клеток MDCK. После изучения токсического действия экстрактов в культуре клеток была исследована противовирусная активность этих образцов в отношении вируса гриппа А в экспериментах *in vitro*. Оценка противовирусного действия экстрактов в отношении вируса гриппа проводилась разными методами.

В первой серии экспериментов оценивалась способность экстрактов защищать клетки от цитопатогенного действия вируса гриппа. Противовирусную активность растительных экстрактов определяли в инфицированных вирусом гриппа культурах клеток MDCK, в которые вносили разные концентрации экстрактов за 24 ч до заражения клеток вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) или A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и в момент их заражения (множественность заражения составляла 0,1 ТЦД₅₀/кл.). Противовирусную эффективность экстрактов определяли по их способности защищать клетки MDCK от цитопатогенного действия вируса в сравнении с контрольными инфицированными культурами (без экстракта). Водный экстракт Цетрарии исландской, внесенный за 24 ч до заражения клеток вирусом, частично (доля защищенных клеток 30,0%) защищал клетки только от патогенного действия вируса гриппа A/Aichi/2/68(H3N2), **в то время как этанольный экстракт этого же лишайника, внесенный на культуру клеток также за 24 ч до их инфицирования, более эффективно защищал клетки от гибели, индуцированной и вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (доля защищенных клеток 49,2%), и вирусом гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) (доля защищенных клеток 50,9%).** Таким образом, наибольшим противовирусным эффектом в этих условиях обладал этанольный экстракт цетрарии исландской — в концентрации 80 мкг/мл он был способен защитить от патогенного действия штаммов A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2). При внесении растительных экстрактов в момент инфицирования клеток вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) **также наблюдали противовирусную активность экстрактов.** В этом случае обнаружен противовирусный эффект для этанольного экстракта Цетрарии исландской (доля выживших клеток составила 40,5%). В аналогичном эксперименте с вирусом другого субтипа (H5N1) **наибольшим противовирусным действием также обладал образец этанольного экстракта Цетрарии исландской.** При внесении экстрактов на клетки MDCK в момент их инфицирования вирусом гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) этот раствор экстракта защищал более 70% клеток MDCK в концентрации 80 мкг/мл.

В дальнейшем была изучена зависимость ингибирования репродукции вируса гриппа (доза инфекции — 100 ТЦД₅₀) в клетках

от концентрации растворов экстрактов. Полное ингибирование репродукции вируса гриппа A/H5N1 с индексом нейтрализации (ИН), равным 5,1 lg, наблюдалось при концентрациях экстрактов в растворе, значительно более низких, чем их максимально переносимые концентрации для клеток MDCK. В аналогичных экспериментах с вирусом гриппа другого субтипа — A/H3N2 установлено, что для водного экстракта Цетрарии исландской вирусингибирующий эффект был незначительным (ИН = 1,5 lg), в то время как, ингибирование репродукции вируса гриппа под влиянием этанольного экстракта этого же лишайника было значительно выше (ИН = 3,0 lg).

Следующим этапом наших исследований была попытка изучения механизма действия экстрактов на репродукцию вируса гриппа в культуре клеток MDCK. Это исследование показало, что в целом растворы экстрактов оказывают выраженное ингибирующее действие на размножение вируса гриппа А. При этом снижение продукции вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) происходит под действием этанольного экстракта в течение 0–6 ч (через 3, 6 ч после заражения), а под действием водного экстракта — в течение 0–24 ч (через 3, 6 и 24 ч после заражения), есть основания полагать, что данные образцы экстрактов влияют на стадию репликации вируса гриппа человека. Для вируса гриппа A/H5N1 установлено, что снижение продукции данного вируса происходит только под влиянием этанольного экстракта Цетрарии исландской при внесении экстракта за 1 ч до заражения клеток вирусом и в течении 0–6 ч. после заражения. (за 1 ч до заражения, через 1, 3, 6 ч после заражения), что дает основания предполагать о влиянии данного образца экстракта, как на стадию адсорбции, так и на стадию репликации данного вируса.

Различие в ингибировании репродукции двух штаммов вируса гриппа под действием образцов исследуемых экстрактов может быть связано с разными вирусными мишенями для экстрактов.

Таким образом, обнаружение противовирусной активности экстрактов Цетрарии исландской делает перспективным данный растительный объект для дальнейшего изучения и разработки на его основе препаратов против гриппа.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ САХА

В. Ю. Марченко, И. М. Суслопаров, Н. И. Гончарова, Н. П. Колосова,
А. В. Шиповалов, Т. Н. Ильичева, А. Г. Дурьманов, А. Б. Рыжиков

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

Высокопатогенные вирусы гриппа субтипа H5 способны вызывать масштабные эпизоотии в популяциях домашних птиц, наносят существенный экономический ущерб и является угрозой для здоровья человека [1, 9]. Вспышки высокопатогенного вируса гриппа птиц регистрируются по сей день, в 2014 году наблюдалось широкое распространение вируса гриппа субтипа H5N8 в Европе и Азии, что ставит мировое сообщество перед вопросом о возникновении нового субтипа вируса гриппа с пандемическим потенциалом.

Настоящее исследование посвящено изучению штамма вируса гриппа A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), выделенного от дикой утки в октябре 2014 года в ходе мониторинга гриппа птиц в северо-восточной части Российской Федерации. Всего за 2014 г. на территории Республики Саха (Якутия) было собрано 835 образцов от птиц.

Штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) был выделен из трахеи свиньи (Anas penelope), добытой на территории поселка Белая Гора в Республике Саха (Якутия). Штамм хорошо культивируется в 10-и дневных развивающихся куриных эмбрионах и обладает высокой степенью репродукции, показывая высокий титр вируса в аллантоисной жидкости. В реакции гемагглютинации максимальный титр вируса составил 5120 ГАЕ/мл. При титровании на РКЭ инфекционный титр вируса составил 6,2 lg ЭИД₅₀. Антигенные свойства штамма исследованы в РТГА [1] с сыворотками и антигенами штаммов вируса гриппа субтипа H5 различных клад, полученными во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) не взаимодействует

с большинством из исследованных антисывороток, кроме сыворотки к штамму A/Common gull/Chany/2006 (H5N1).

С целью определения пандемического потенциала штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) были определены количественные показатели инфекционности и вирулентности для лабораторных мышей. Величина 50 %-ной инфекционной дозы (ID_{50}) при интраназальном заражении мышей линии Balb/c составила 2,9 lg EID_{50} . Летальная доза (LD_{50}) для мышей составила 4,1 lg EID_{50} , что указывает на наличие вирулентности исследуемого штамма для млекопитающих [4].

Был проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов гемагглютинаина и нейраминидазы. Последовательности депонированы в базе данных GISAID (EPI553349, EPI553350).

Анализ нуклеотидной последовательности гемагглютинаина выявил наличие сайта протеолитического расщепления PLR-ERRRKRGLF, что является признаком высокой патогенности штамма для птиц [1].

Филогенетический анализ показал высокую степень гомологии генов HA и NA штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) с нуклеотидной последовательностью штаммов Евразийской линии, выделенных в Юго-восточной Азии от домашней птицы.

Анализ первичной структуры гемагглютинаина выявил 1 мутацию, расположенную в сайтах связывания антител, что указывает на антигенный дрейф гемагглютинаина H5 по отношению к ранее выделенным вариантам. Мутация A201E встречается только один раз в штамме A/chicken/Egypt/Q1769B/2010(H5N1), выделенном в Египте в мае 2010 года. В гене NA найдено 2 мутации A190T и G271R, которые отличают его от консенсусной последовательности гена N8, и, возможно, мутация G271R может влиять на резистентность к ингибиторам нейраминидазы. Однако, результаты наших исследований активности нейраминидазы штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) в присутствии препаратов занамивир и озельтамивир показали, что 50 % ингибирующая доза препарата озельтамивир составила 0,1 nM, занамивира — 0,05 nM, что по критериям ВОЗ позволяет отнести этот штамм к разряду высокочувствитель-

ных к ингибиторам нейраминидазы. Полученные данные имеют важное значение для оценки возможного пандемического риска циркулирующего вируса гриппа А(Н5N8).

Территория Республики Саха является регионом, играющим важную роль в экологии вируса гриппа. Данный регион располагается на пересечении нескольких пролетных путей диких птиц. На территории республики обитает более 300 видов диких птиц, из которых около 220 являются мигрирующими [9]. Это указывает на широкие территориальные связи различных видов птиц, в частности, водоплавающих, которые являются основным резервуаром вируса гриппа птиц [9]. Выделение штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) в России, очевидно, указывает на его распространение мигрирующими дикими птицами из Юго-Восточной Азии. Также он, предположительно, был занесен в 2014–2015 гг. в Европу и Северную Америку в результате приполярной миграции птиц [6, 7]. Вспышки высокопатогенного вируса гриппа птиц на территории России регистрируются с 2005 года [5], однако, не все они имели массовый характер. Хронология и характер вспышек высокопатогенного вируса H5N8 в Юго-Восточной Азии, Европе, Северной Америке и появление его на территории России ставит мировое сообщество перед вопросом о возникновении нового субтипа вируса гриппа с пандемическим потенциалом, и, возможно, указывает на способность перелетных птиц к переносу гриппа из Юго-Восточной Азии в Европу, используя приполярный путь миграции через Российское побережье Северного Ледовитого океана. Эта гипотеза также подтверждается исследованиями Verhagen J. H. с соавт. и Ip H. S. с соавт. [3, 6, 7].

На сегодняшний день не зарегистрировано ни одного случая заражения человека вирусом гриппа H5N8, **но результаты наших исследований**, указывающие на его инфекционность и вирулентность для млекопитающих, а также на его генетическую близость со штаммами, выделенными в Юго-Восточной Азии и в Западной Европе, подчеркивают важность принятия своевременных мер по контролю над распространением вируса гриппа птиц на территории Сибири и Дальнего Востока.

Список литературы

1. Alexander D. J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 2000. V. 74. P. 3–13.
2. Hoffmann E., Stech J., Guan Y. et al. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146:2275–2289.
3. Ip H. S., Torchetti M. K., Crespo R. et al. Novel eurasian highly pathogenic avian influenza A H5N1 viruses in wild birds, Washington, USA, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015 May;21(5):886–90.
4. Maines T. R., Lu X. H., Erb S. M. et al. Avian Influenza (H5N1) Viruses Isolated from Humans in Asia in 2004 Exhibit Increased Virulence in Mammals. *J Virol.* 2005 Sep; 79(18): 11788–11800.
5. Sharshov K., Romanovskaya A., Uzhachenko R. et al. Genetic and biological characterization of avian influenza H5N1 viruses isolated from wild birds and poultry in Western Siberia. *Arch Virol.* 2010. 155(7): 1145–1150.
6. Verhagen J. H., Herfst S., and Ron A. M. Fouchier. Wild birds may spread the H5N8 virus. *Science* 6 February 2015: Vol. 347. Issue 6222. 616-617.
7. Verhagen J. H., van der Jeugd H. P., Nolet B. A. et al. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways. *Euro Surveill.* 2015;20(12):pii=21069.
8. Vladimirtseva M. V., Germogenov N. I. Birds of Yakutia: Fauna Diversity, Ecology, Role in Ecosystems and Human Life. *J Biodivers Endanger Species.* 2013: 1:114.
9. Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* 1992. 56:152–179.

ОЦЕНКА ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОТИВООСПЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НИОХ-14

О. Ю. Мазурков¹, А. С. Кабанов¹, М. О. Скарнович¹,
Н. И. Бормотов¹, М. А. Скарнович¹, О. А. Серова¹,
Л. Н. Шишкина¹, А. А. Чернонос²

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», ² ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Актуальность. После завершения программы «глобальной ликвидации оспы» на Земле благодаря массовой иммунизации населения и отмены вакцинации против оспы в 1980 году, в мире сложилась опасная ситуация, когда более половины людей на планете не имеет иммунитета против ортопоксвирусных инфекций. Ортопоксвирусы могут вызывать у людей спектр заболеваний в широком диапазоне клинических проявлений: от серьезных диссеминированных повреждений в случае заражения вирусом натуральной оспы (ВНО) до локальных повреждений при инфекции, вызванной вирусом оспы коров. Более того, в настоящее время существует угроза возникновения оспы, поскольку невозможно исключить наличие нелегального хранения ВНО и преднамеренного использования против населения природных или рекомбинантных штаммов ВНО и вируса оспы обезьян (ВОО) в качестве биологического оружия. Недавно в США был разработан противооспенный препарат ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-етеноциклопроп[f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид). При этом наиболее полное исследование противовирусной эффективности ST-246 было проведено на модели летальной инфекции мышей вирусом экстремелии (ВЭ), который является естественным патогеном для мышей и вызывает у них генерализованное заболева-

ние, называемое мышьиной оспой, аналогичное оспе у человека. Совместно с Новосибирским институтом органической химии Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН) нами было получено новое химическое соединение НИОХ-14 (7-[N'-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота), обладающее сравнимой с ST-246, активностью в отношении ортопоксвирусов.

Цель исследования. Изучение фармакодинамических и фармакокинетических показателей противооспенного химического соединения НИОХ-14 в экспериментах на мышах.

Материалы и методы. В экспериментах использовались аутбредные мыши ICR массой 12–14 г. Мышей интраназально заражали ВЭ (штамм К-1) в дозе 10 ЛД₅₀/гол. (10 × 50% летальных доз/голову). Инфицированным ВЭ мышам перорально вводили препараты ST-246 и НИОХ-14 в различных дозах схемах. Концентрацию ВЭ в сыворотке крови и 10%-х гомогенатах органов определяли методом титрования в культуре клеток Vero (в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц — lg БОЕ/мл).

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

Определение фармакокинетических параметров активного метаболита ST-246 и вторичного метаболита К в сыворотке крови и гомогенатах органов мышей осуществляли с помощью масс-спектрометрического анализа, который проводили в режиме SIM (single reaction monitoring) для ионов с m/z 375 (ST-246), 189 (метаболит К) и 337 (внутренний стандарт N-98).

Для изучения фармакокинетики НИОХ-14 вводили мышам в дозе 50 мкг/г массы мыши однократно перорально в 0,2 мл раствора метилцеллюлозы с твином-80. Через 1, 6, 9, 12, 15, 18, 24 и 48 ч эвтаназировали по 6 мышей и производили забор крови, легких, селезенки, печени, почек и мозга. Затем в образцах сыворотки крови и гомогенатов органов мышей определяли концентрацию метаболитов

НИОХ-14: активного метаболита ST-246 и вторичного метаболита К по калибровочным кривым.

Определяли следующие фармакокинетические параметры:

1. Время полувыведения $T_{1/2}$ (ч) — время, в течение которого концентрация препарата в крови (органе) снижается на 50%, величина постоянная и не зависит от дозы или начальной (максимальной) концентрации препарата в крови (органе).

2. Время достижения максимальной концентрации $T_{\max}$ (ч) — время, за которое достигается максимальная концентрация вещества в крови (органе).

3. Максимальная концентрация $C_{\max}$ (нг/мл) — максимально достигаемая концентрация лекарственного средства в крови (органе).

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

5. Тканевая доступность (f_T) для органов (%) — проникновение вещества в ткани по формуле $f_T = AUC_{0-\infty-T} : AUC_{0-\infty-S}$ (где $AUC_{0-\infty-T}$ — площадь под кривой «концентрация — время» от 0 до ∞ в ткани органа, $AUC_{0-\infty-S}$ — площадь под кривой «концентрация — время» от 0 до ∞ в сыворотке крови).

Результаты исследования. Было показано, что при пероральном введении препаратов НИОХ-14 и ST-246 их 50%-е эффективные дозы ($ЭД_{50}$) для мышей, инфицированных ВЭ, достоверно не отличались и составили 3,59 и 5,08 (мкг/г массы мыши) соответственно. При определении «терапевтического окна» было обнаружено, что начало введения мышам НИОХ-14 за 1 сут или за 1 ч до заражения, а также через 1, 2 и 4 сут после заражения и далее в течение 9 сут обеспечивало 100%-ю выживаемость животных. Начало введения НИОХ-14 через 5 и 6 сут после инфицирования приводило к снижению выживаемости мышей до 60%, хотя она оставалась выше, чем в контрольной группе. Введение НИОХ-14, так же как ST-246, приводило к достоверному снижению относительно контроля титров ВЭ в легких, носовой полости, головном мозге, печени, селезенке, почках и поджелудочной железе.

В таблицах 1 и 2 представлены фармакокинетические параметры активного метаболита ST-246 (табл. 1) и вторичного метаболита К (табл. 2) в сыворотке крови и органах мышей при однократном пероральном применении НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы мыши.

Заключение. По-видимому, НИОХ-14, являясь аналогом ST-246, имеет такой же механизм действия, а именно, ингибирует вирусный белок р37 и препятствует освобождению внеклеточных форм вируса, которые обеспечивают диссеминацию вируса в организме и развитие заболевания.

Полученные нами результаты доказывают, что эффективность отечественного соединения НИОХ-14 по всем исследованным фармакодинамическим показателям сопоставима с эффективностью антиортопоксвирусного препарата ST-246, который разработан и в настоящее время проходит клинические испытания в США.

Фармакокинетические параметры активного метаболита ST-246 в сыворотке крови и органах свидетельствуют о высокой тканевой биодоступности НИОХ-14.

Таблица 1

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

Параметры (размерность)	Сыворотка крови	Легкие	Печень	Селезенка	Мозг	Почки
$t_{1/2}$ (ч)	4,20	12,46	5,59	8,51	13,22	5,54
T_{max} (ч)	6	9	6	9	9	6
C_{max} (нг/мл)	2057,71 ± 641,21	2008,86 ± 1745,96	1043,12 ± 514,02	286,33 ± 158,16	251,90 ± 38,07	1072,04 ± 453,41

Окончание табл. 1

AUC 0-t (нг/ мл)×ч	22665,56	21879,51	15025,60	3988,52	4276,72	13813,37
AUC 0-inf (нг/ мл)×ч	23550,52	23972,45	16390,92	4786,15	6314,47	14909,68
t_T (%)	-	100	69,6	20,3	26,8	63,3

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

Таблица 2

Фармакокинетические параметры вторичного метаболита К в сыворотке крови и органах мышей при однократном пероральном применении НИОХ-14 в дозе 50 мкг/г массы мыши

Параметры (размерность)	Сыворотка крови	Легкие	Печень	Селезенка	Мозг	Почки
$t_{1/2}$ (ч)	9,74	34,34	9,33	10,47	17,80	17,38
$T_{\max}$ (ч)	9	15	6	15	9	6
$C_{\max}$ (нг/ мл)	227,13 ± 59,47	341,92 ± 407,21	459,18 ± 229,55	237,55 ± 112,95	353,44 ± 79,54	306,32 ± 108,20
AUC 0-t (нг/мл)×ч	3313,79	10191,42	6103,52	4359,65	5959,15	3395,14
AUC 0-inf (нг/ мл)×ч	4406,11	18608,58	7622,15	6264,13	11129,91	5111,11

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

ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ВИРУСУ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН МЫШИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

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

*ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»),
630559, п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия*

В настоящее время в качестве мелких модельных животных для оспы обезьян при оценке эффективности противовирусных препаратов используют иммунодефицитных мышей, частично воспроизводящих инфекционный процесс у людей с подавленной иммунной системой, доля которых во время эпидемических вспышек оспы обезьян, вероятно, не очень значительна. Поэтому иммунодефицитные мыши не являются абсолютно адекватной модельной системой *in vivo* для оценки противовирусного действия препаратов. Данное исследование было направлено на изучение возможности применения с этой целью иммунокомпетентных мышей аутобредной популяции ICR.

В работе были использованы вирусологические, гистологические и электронно-микроскопические методы исследований.

При интраназальном (и/н) заражении мышей вирусом оспы обезьян (ВОО, штамм V79-1-005) были зарегистрированы некоторые клинические признаки заболевания: гнойный конъюнктивит, блефарит, взъерошенность шерсти. 50%-я инфицирующая доза, оцениваемая по наличию внешних клинических проявлений (KID_{50}) ВОО для этих животных, равнялась $4,8 \log_{10}$ БОЕ, а LID_{50} , оцениваемая по наличию вируса в легких мышей через 7 сут после заражения (п/з) с учетом 10%-й его аппликации в респираторном тракте животных, составляла $1,4 \log_{10}$ БОЕ и была близка к таковой у человека, теоретически определенной по наличию клинической картины заболевания (А. А. Сергеев et al., 2015).

При изучении динамики распространения ВОО в организме и/н зараженных мышей 25–30 LD_{50} через 7 сут п/з было обнаружено максимальное накопление патогена в слизистой носовой полости, легких и головном мозге: $5,7 \pm 0,1$, $5,5 \pm 0,1$ и $5,3 \pm 0,3 \log_{10}$ БОЕ/мл гомогената органа соответственно.

При проведении световой микроскопии органов и тканей этих животных были зарегистрированы воспалительно-пролиферативные и некротические изменения (в основном в органах респираторного тракта), которые напоминали таковые у известных модельных животных для оспы обезьян (I.M. Langohr et al., 2004; A.J. Goff et al., 2011; A.A. Sergeev et al., 2015). В результате электронно-микроскопического исследования органов и тканей этих животных отмечены факты присутствия и размножения патогена в традиционных первичных клетках мишенях для ВОО (в клетках системы мононуклеарных фагоцитов и эпителиоцитах органов респираторного тракта), а также в некоторых других клетках организма (эндотелиоцитах, клетках соединительной ткани).

Использование мышей аутбредной популяции ICR при оценке противовирусной эффективности двух противооспенных препаратов (НИОХ-14 и ST-246) продемонстрировало наличие значимого эффекта по снижению продукции ВОО в легких у инфицированных мышей и адекватность полученных нами результатов таковым, описанным в научной литературе (G. Yang et al., 2005; А. С. Кабанов и др., 2013; E. M. Mucker et al., 2013).

Таким образом, иммунокомпетентные мыши аутбредной популяции ICR могут быть использованы в качестве модельных животных для оспы обезьян с целью оценки эффективности противовирусных препаратов в отношении ВОО.

**ЦИРКУЛЯЦИЯ НОВЫХ И ИЗВЕСТНЫХ СЕРОТИПОВ
ПАРАМИКСОВИРУСОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ ДИКИХ ПТИЦ
НА ТЕРРИТОРИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН В 2013–2014 ГГ.**

А. Б. Сейдалина, Е. Я. Хан, К. О. Карамендин,
А. И. Кыдырманов, К. Д. Даулбаева, С. Е. Асанова,
Е. Т. Касымбеков, К. Х. Жуматов, М. Х. Саятов

*Республиканское государственное предприятие на праве хозяй-
ственного ведения «Институт микробиологии и вирусологии»
Комитета науки Министерства образования и науки
Республики Казахстан*

РНК-содержащие парамиксовирусы (ПМВ) птиц относятся к роду *Avulavirus* семейства *Paramyxoviridae* и вызывают массовые инфекции домашних, синантропных и диких птиц, протекающие в виде эпизоотий, энзоотий и латентного вирусоносительства без проявления клинических признаков болезни [1]. Род авуловирусов объединяет известные к настоящему времени ПМВ птиц 12 серотипов (ПМВ-1 — ПМВ-12), которые поражают птиц 241 вида, относящихся к 27 отрядам авифауны во всех регионах мира. Дикая авифауна играет ключевую роль в сохранении ПМВ в биосфере и является потенциальным природным источником возникновения новых опасных вариантов вирусов [1; 2; 3].

Целью работы, проведенной в 2013 и 2014 гг., явилось вирусологическое исследование ПМВ, циркулирующих в популяциях диких птиц в различных регионах Казахстана.

Материал собран в местах массовых скоплений мигрирующих и гнездящихся птиц в Центральном Казахстане (Тенгиз-Коргалжынская система озер), на побережье Каспийского моря и на территории Балхаш-Алакольской системы озер.

При вирусологическом исследовании биологических проб, собранных в 2013 г. в Западном, Южном и Центральном Казахстане

от 165 диких птиц водного и околоводного комплексов, на 10-дневных развивающихся куриных эмбрионах выделено 20 гемагглютинирующих агентов. Идентификация их в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к консервативному участку L-гена, общему для всех ПМВ, позволила отнести 18 агентов к этому семейству.

В результате последующего секвенирования продуктов амплификации L-гена и проведения сравнительного BLAST-анализа полученных нуклеотидных последовательностей с таковыми депонированными в Genbank, установлена принадлежность одного из них к ПМВ-1, шести к ПМВ-8 и одного — к ПМВ-6. В соответствии с этим изоляты получили следующие обозначения: ПМВ-1/огарь/Чокпак/5717/13, ПМВ-6/красноносый нырок/Балхаш/5842/13, ПМВ-8/белолобый гусь/СКО/5747/13, ПМВ-8/белолобый гусь/СКО/5749/13, ПМВ-8/пискулька/СКО/5764/13, ПМВ-8/белолобый гусь/СКО/5765/13, ПМВ-8/лебедь кликун/СКО/5767/13, ПМВ-8/кулик-воробей/Чокпак/5669/13.

Анализ нуклеотидных последовательностей десяти других изолятов, выделенных в 2013 году от четырех видов птиц (пискульки, белолобого гуся, озерной чайки, шилохвосты), выявил, их значительные генетические расхождения по консервативному фрагменту L-гена от известных в науке серотипов ПМВ, что позволило высказать предположение об их принадлежности к новым ранее неизвестным генотипам вируса этого семейства.

При исследовании биопроб, полученных от диких птиц в 2014 г. в Западном Казахстане, выделены шесть изолятов ПМВ, нуклеотидная последовательность фрагментов L-генов которых так же значительно отличалась от аналогичных последовательностей уже известных серотипов вируса.

Таким образом, в 2013–2014 гг. на территории Казахстана циркулировали ПМВ птиц, принадлежавшие к трем из двенадцати известных к настоящему времени серотипам вирусов этого семейства. Получены новые данные о циркуляции в РК ПМВ птиц ранее неизвестных серотипов, что указывает на необходимость проведения постоянного мониторинга вирусов этого семейства в популяциях диких птиц.

Список литературы

- 1 Nichole L. Hines, Cathy L. Miller Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease Distribution, Clinical Symptoms, and Laboratory Diagnostics Hindawi Publishing Corporation // Vet. Med. Inter. — 2012. — Vol. 2012. — 17 p. doi:10.1155/2012/708216.
2. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections / In: Diseases of Poultry. — Ames, IA: Iowa State Press, 2003. — 1248 p.
3. Briand F. X., Henry A., Massin P., Jestin V. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus // J. Virology Vol. 86 (14). — p. 7710.
4. Alexander D.J. Ecology and epidemiology of Newcastle disease. In: Capua, I., Alexander, D.J. / Eds. Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual. — 2009. — P. 19–26.

ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ *IN VITRO* И ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А(Н3N2), А(Н1N1), А(Н5N1) И А(Н7N9) *IN VIVO*

М. А. Скарнович, М. О. Скарнович, О. Ю. Мазурков, Л. Н. Шишкина

*Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный
научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

Актуальность. Грипп представляет собой серьезную проблему общественного здравоохранения. Вирус гриппа (ВГ) А является самым известным и распространённым среди вирусов, обуславливающих инфекционные заболевания верхних дыхательных путей. Сезонными штаммами ВГ А являются представители двух основных субтипов Н1N1 и Н3N2, при этом каждый из них имеет множество постоянно изменяющихся разновидностей. Как правило, в эпидемические периоды доминирует ВГ А/Н3N2. В настоящее время значительный

вклад в развитие эпидемий гриппа вносит появившийся в 2009 г. новый пандемический ВГ A(H1N1)pdm09, характерной особенностью которого является то, что он продемонстрировал способность вызывать быстро прогрессирующее заболевание лёгких, лечить которое чрезвычайно сложно. С 1997 г. объектом пристального внимания стал вирус гриппа птиц A(H5N1), учитывая высокий уровень контагиозности для человека, он может стать причиной пандемии гриппа. В марте 2013 года в Китае впервые зафиксированы случаи заражения людей ВГ птиц A/H7N9, приводящие к смертельным исходам. Из существующих противовирусных препаратов в отношении ВГ наиболее активны ингибиторы нейраминидазы (Тамифлю — озельтамивир, Реленза — занамивир и др.). В связи с ежегодными эпидемиями гриппа, возможностью заражения людей ВГ животного происхождения остро встаёт вопрос об изучении биологических свойств штаммов ВГ для дальнейшего тестирования и выбора надёжных средств их профилактики и лечения.

Цель исследования. Изучение чувствительности к противовирусным препаратам в культуре клеток MDCK и патогенных свойств ВГ A различных субтипов в экспериментах на аутбредных мышах ICR.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы ВГ A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Bishkek/03/2009 (H1N1)pdm09, A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Anhui/1/2013 (H7N9), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Титр вируса определяли в культуре клеток MDCK (клетки почки собаки) по методу Спирмена-Кербера, выражали в десятичных логарифмах 50%-х тканевых цитопатических дозах в 1 мл ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$). Оценку чувствительности исследованных штаммов ВГ к противовирусным препаратам производили в культуре клеток MDCK. В работе использовали коммерчески доступные в аптечной сети противовирусные препараты: ингибитор нейраминидазы Тамифлю (Ля Рош Лтд., Швейцария) в концентрации 100 мкг/мл, ингибитор М2-белка Ремантадин (ОАО «Биосинтез», Россия) — 10 мкг/мл и Ингавирин (ОАО «Валента Фармацевтика», Россия) — 200 мкг/мл. Определяли титр ВГ (в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$) при его культивировании в присутствии препаратов и в контроле. Эффектив-

ность препаратов оценивали по индексу нейтрализации (ИН, в lg) ВГ, где $ИН = \text{Титр}_{\text{контроль}} - \text{Титр}_{\text{опыт}}$.

При интраназальном заражении мышей аутбредной популяции ICR определяли 50 %-ю летальную дозу ($ЛД_{50}$) и 50 %-ю инфицирующую дозу ($ИД_{50}$) для каждого штамма ВГ. $ЛД_{50}$ и $ИД_{50}$ выражали в lg ТЦД₅₀/голову с учетом 95 %-х доверительных интервалов ($\pm I_{95}$), вычисленных по методу Спирмена-Кербера.

Результаты исследования. Чувствительность штамма A/Aichi/2/68 (H3N2) (титр в контроле $7,6 \pm 0,7$ lg ТЦД₅₀/мл) к исследуемым препаратам *in vitro* была следующая: для Тамифлю ИН = 4,7 lg, для Ремантадина ИН = 2,0 lg, для Ингавирина ИН = 1,7 lg при достоверном ($p \leq 0,05$) снижении титров во всех случаях. Менее выраженную чувствительность к противовирусным препаратам проявлял штамм A/Bishkek/03/2009 (H1N1)pdm09 (титр в контроле $7,1 \pm 0,6$ lg ТЦД₅₀/мл): для Тамифлю ИН = 2,2 lg, для Ремантадина ИН = 0 lg и для Ингавирина ИН = 0,5 lg. Штамм A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) (титр в контроле $7,3 \pm 0,7$ lg ТЦД₅₀/мл) чувствителен к Тамифлю (ИН = 3,3 lg), Ремантадину (ИН = 2,2 lg) и Ингавирину (ИН = 1,2 lg) с достоверным снижением титров под влиянием этих препаратов. В отношении штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9) (титр в контроле $10,5 \pm 0,5$ lg ТЦД₅₀/мл) *in vitro* наиболее выраженную активность проявляет Тамифлю (ИН = 3,0 lg), тогда как Ремантадин (ИН = 1,67 lg) и Ингавирин (ИН = 1,5 lg) были менее активны при достоверном понижении титров под их влиянием.

Были определены показатели $ЛД_{50}$ и $ИД_{50}$ для штаммов ВГ A/Anhui/1/2013 (H7N9), A/Bishkek/03/2009 (H1N1)pdm09, A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и A/Aichi/2/68 (H3N2) (табл.). Полученные показатели для штамма ВГ A/Bishkek/03/2009 (H1N1)pdm09 свидетельствовали о его высокой патогенности для аутбредных мышей ICR без предварительной адаптации к данному виду животных. Наиболее патогенным для аутбредных мышей ICR оказался штамм ВГ A/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), поскольку его $ЛД_{50}$ и $ИД_{50}$ имели самые низкие значения (табл.). При этом наименее патогенными свойствами для данной популяции мышей обладал штамм ВГ A/

Anhui/1/2013 (H7N9), поскольку его ЛД₅₀ и ИД₅₀ были самыми высокими среди всех полученных соответствующих значений (табл.).

**Показатели ЛД₅₀ и ИД₅₀ при интраназальном заражении
аутбредных мышей ICR штаммами ВГ А(Н7N9),
А(Н1N1), А(Н5N1) и А(Н3N2)**

Штаммы вируса гриппа	ЛД ₅₀		ИД ₅₀	
	lg ТЦД ₅₀ / гол., ±I ₉₅	ТЦД ₅₀ /гол.	lg ТЦД ₅₀ / гол., ±I ₉₅	ТЦД ₅₀ /гол.
A/Aichi/2/68 (H3N2)	2,3 ± 0,33	200	0,1 ± 0,33	1,26
A/Bishkek/03/2009 (H1N1)pdm09	1,1 ± 0,57	12,6	0,8 ± 0,57	6,3
A/Chicken/ Kurgan/05/2005 (H5N1)	0,1 ± 0,33	1,26	-0,4 ± 0,33	0,4
A/Anhui/1/2013 (H7N9)	4,3 ± 0,44	19953	0,9 ± 0,44	7,9

Примечание: значения указаны как М±I₉₅, М — концентрация вируса, I₉₅ — 95 %-й доверительный интервал.

Закключение и выводы. Полученные результаты показывают, что наибольшей чувствительностью все исследованные в данной работе штаммы ВГ субтипов А(Н3N2), А(Н1N1), А(Н5N1) и А(Н7N9) обладают к ингибитору нейраминидазы Тамифлю, под влиянием которого индексы нейтрализации достигают наиболее высоких значений. Установлено, что все исследованные в работе штаммы ВГ субтипов А(Н3N2), А(Н1N1)pdm09, А(Н5N1) и А(Н7N9) обладают высокой патогенностью для аутбредных мышей ICR, судя по показателям ЛД₅₀ и ИД₅₀, что позволит в дальнейшем проводить сравнительные исследования эффективности различных противогриппозных препаратов в отношении данных штаммов ВГ *in vivo*.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МТТ-МЕТОДА ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АНТИ-ВИЧ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

П. Ю. Ачигечева, Ю. В. Никонорова,
С. М. Балахнин, Н. М. Гашникова

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

Выявление новых препаратов, обладающих противовирусной активностью не теряет своей актуальности. Для оценки анти-ВИЧ активности химических соединений чаще всего применяется ИФА метод для определения степени подавления накопления белка р24. Однако этот метод достаточно трудоемкий и затратный.

Использование МТТ–метода при работе с вирусом ВИЧ-1 на культуре клеток затруднительно ввиду того, что вирус, как правило, не вызывает острую инфекцию с деструкцией клеток в течение 4-6 суток. Исключение составляет суспензионная культура клеток МТ-4, при размножении на которой некоторые лабораторные штаммы и изоляты вируса, с тропностью CXCR4, способны вызывать полную деструкцию клеток уже на 5 сутки после заражения.

В настоящее время на территории России наиболее распространён субтип А ВИЧ-1, и его различные рекомбинантные формы (CRF). Считается, что определение противовирусной активности препаратов лучше всего проводить по отношению к актуальным (циркулирующим в данное время) субтипам ВИЧ-1.

В нашей лаборатории был получен изолят ZN субтипа А ВИЧ-1 с тропностью CXCR4 который вызывает 100% деструкцию клеток МТ-4. После нескольких пассажей на культуре клеток МТ-4 он получил название MTZN.

Для оценки противовирусной активности и цитотоксичности различных химических соединений, с целью поиска новых перспективных противовирусных препаратов нами был освоен МТТ-метод,

определяющий метаболическую активности клеток. Метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 — 2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан, который кристаллизуется внутри живых клеток. Результаты цитотоксичности и противовирусной активности, исследуемых соединений, определяют по жизнеспособности клеток относительно контроля, измеряя оптическую плотность при помощи фотометрии. По полученным данным строят график зависимости жизнеспособности клеток, от возрастающих доз соединения и вычисляют 50 % токсическую концентрацию (TC_{50}) и 50 % ингибирующую концентрацию (IC_{50})

Использование этого метода позволяет проводить скрининговые исследования большого количества химических соединений.

В виде тестовых испытаний были проверены анти-ВИЧ субстанции МТТ-методом (табл. 1).

Таблица 1

Определение МТТ-методом 50% токсической концентрации (TC_{50}) и 50% ингибирующей концентрацию (IC_{50}) анти-ВИЧ субстанций

	TC_{50} , мкг/мл	IC_{50} , мкг/мл
Абакавир	55,43	0,66
Зидовудин	14,84	0,005
Ставудин	28,73	0,048
Лопинавир	17,82	0,00062
Ритонавир	22,02	0,035

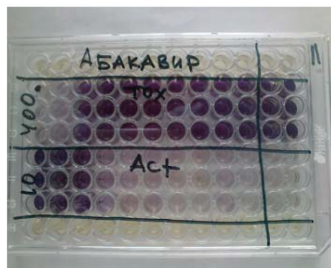
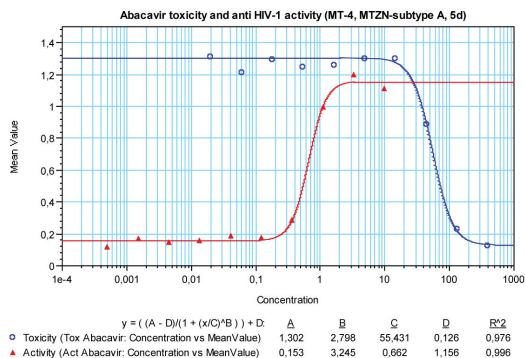


Рис. 1. Определение цитотоксичности и анти-ВИЧ активности на примере Абакавира (MT-4, MTZN субтип А ВИЧ-1)

Таким образом, получение данных по цитотоксичности и противовирусной активности коммерческих препаратов обладающих анти-ВИЧ активностью с использованием изолята MTZN на культуре клеток MT-4 позволяет проводить тестирование МТТ методом.

РАЗДЕЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

РАЗРАБОТКА ОТ-ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Б. М. Исмагамбетов, М. И. Богданова, Ж. К. Кошеметов,
В. М. Матвеева, С. Ш. Нурабаев, Г. Д. Сугирбаева,
Н. К. Оразымбетова

*Научно-исследовательский институт проблем биологической
безопасности РГП НИИПББ КН МОН РК. Жамбылская обл.,
Кордайский р-н, пгт Гвардейский*

Ключевые слова: *вирус бешенства, ОТ-ПЦР, амплификация, патологический материал, электрофорез, РНК.*

Введение

Бешенство входит в пятёрку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший экономический ущерб, который складывается из потерь в результате падежа животных, затрат на проведение карантинных и профилактических мероприятий, на отлов бродячих собак и кошек, регулирование численности диких хищников, а также на проведение диагностических исследований.

Азиатский континент в течение многих лет известен как один из серьезных эндемических очагов бешенства. В большинстве азиатских стран доминируют эпизоотии собачьего бешенства. По эпи-

зоотиям собачьего бешенства в настоящее время являются неблагополучными Индия, Индонезия, Пакистан, Непал, Лаос, Шри-Ланка, Бирма, Филиппины, Афганистан, Южная Корея, КНДР, Таиланд, Ирак, Камбоджа. Спорадическая заболеваемость.

Современная и точная лабораторная диагностика бешенства, особенно экспресс-диагностика, остается актуальной для практической ветеринарной медицины.

В связи с этим, целью наших исследований была разработка ОТ-ПЦР для идентификации вируса бешенства.

Материалы и методы

В процессе проведения экспериментальных исследований был использован вирулентный штамм «CVS» вируса бешенства и пробы патологических материалов в виде мозга от павших животных.

Выделение РНК проводят с использованием набора QIAamp® ViralRNA MiniKit в соответствии с наставлением по применению данного набора.

В исследованиях использовали пару праймеров Rab-f и Rab-r. Данные праймеры ограничивают участок РНК размером 332 п.н.

Для электрофоретического анализа кДНК-амплификатов используют 1,0% раствор агарозы в ТБЕ.

Результаты

С целью подбора праймеров для выявления вируса бешенства, был проведен поиск и сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей вируса бешенства из сети Internet и в международной базе данных GeneBank.

По результатам сравнительного анализа, была выбрана одна пара наиболее специфичных праймеров. Данная пара праймеров нарабатывает ПЦР- продукт размером 332 п.н.

Эффективность метода ПЦР и его специфичность зависит от многих параметров, включающих буферный состав реакционной смеси, температурно-временной режим амплификации, концентрацию фермента в реакционной смеси, количество ДНК матрицы, концентрацию праймеров.

Результаты исследований показали, что наиболее оптимальной температурой плавления отжига, для подобранной пары прайме-

ров, является 55°C, концентрация $MgCl_2$ — 2,5 мМ, праймеров — 0,4 мМ/мкл, чувствительность метода ПЦР составила 0,6 пг РНК ВБ в пробе.

В результате, оптимизированный нами метод ОТ-ПЦР был испытан на пригодность и эффективность при исследовании проб патологического материала, взятого от павших животных, с подозрением на бешенство. Патологический материал был отобран в ходе эпизоотологического мониторинга, проводимого в 2014 году сотрудниками НИИПББ РК в Республике Таджикистан. Результаты данных исследований представлены на рис. 1.

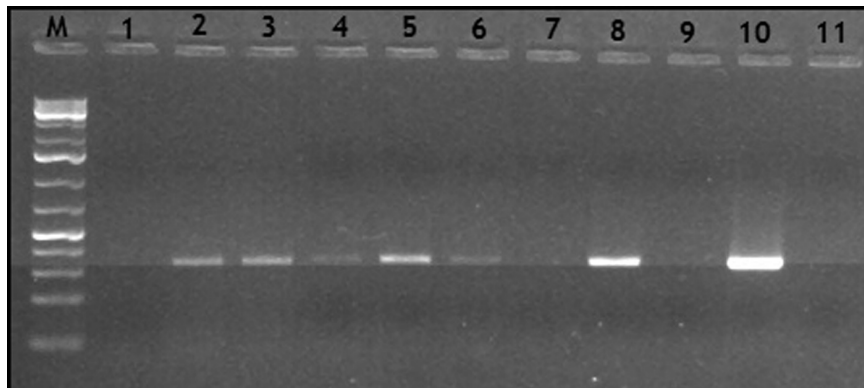


Рис. 1. Исследование в ОТ-ПЦР полевых проб патологического материала с праймерами Rab-фи Rab-г: М — маркер ДНК 1kbFermentas, 1 — пробы от сурка (Чиргатальский район), 2 — пробы от собаки 1 (г. Душанбе), 3 — пробы от собаки (Еванский район), 4 — пробы от КРС (Раштский район), 5 — пробы от собаки 2 (г. Душанбе), 6 — пробы от КРС 1 (Файзабадская обл.), 7 — пробы от летучей мыши, 8 — пробы от КРС 2 (Файзабадская обл.), 9 — пробы от МРС (Софорова), 10 — РНК вируса бешенства, 11 — деионизированная вода

На рис. 1 видно, что из 9 исследованных проб мозга, взятых от павших животных с подозрением на бешенство, в шести была выявлена РНК вируса бешенства. По результатам ОТ-ПЦР можно судить, что в Республике Таджикистан среди собак активно циркулирует возбудитель вируса болезни бешенства.

Данные результаты показали, что отработанный метод ПЦР обладает высокой специфичностью, чувствительностью и эффективностью.

Таким образом, в результате приведенных исследований, по применению оптимизированного метода ОТ-ПЦР для обнаружения вируса бешенства, из патологических материалов от павших животных, доставленных из Республики Таджикистан был обнаружен РНК вируса бешенства. Предложенный метод ОТ-ПЦР является специфичным и чувствительным и позволяет достоверно определять наличие РНК вируса бешенства в биологических пробах без предварительного накопления тестируемого вируса. Данный метод в дальнейшем будет использован для экспресс-идентификации данного возбудителя.

ВКЛАД ЭФФЛЮКС СИСТЕМЫ *MARCAV SERRATIA* *MARCESCENS* В УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

Т. В. Ширшикова¹, Л. Х. Камалетдинова¹, А. М. Марданова¹,
М. Р. Шарипова¹, Л. М. Богомольная^{1,2}

¹ ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», ² Техасский Аграрно-Технический Университет,
г. Колледж Стэйшн, Техас, США

Многие заболевания человека и животных вызываются бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, в частности, такими известными патогенами, как *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae* и другие.

В отличие от этих болезнетворных микробов, бактерия *Serratia marcescens* обычно обитает вне организма человека. В связи с этим, долгое время считалось, что *S. marcescens* не является патогеном, и лишь в последние годы были получены данные о том, что *S. marcescens* является одним из опасных возбудителей внутрибольничных инфекций [Abbott et al., 1999; Hejazi et al., 1997; Mahlen, 2011; Ostrowsky et al., 2002].

В середине 1970-х годов было показано, что *S. marcescens* способен вызвать широкий спектр инфекционных заболеваний. Установлено, что у многих пациентов больничных стационаров *S. marcescens* может вызывать заболевания центральной нервной системы (менингит), инфекции мочеполовой системы, болезни дыхательных путей, эндокардит и сепсис. Наибольшую опасность *S. marcescens* представляет для пациентов групп риска, в частности, для больных с ослабленной иммунной системой, находящихся в палатах интенсивной терапии. Основной проблемой эффективного лечения инфекций, вызванных *S. marcescens*, также является уникальная устойчивость к большинству классов антибиотиков [Mahlen, 2011]. В частности, большинство клинических изолятов *S. marcescens* устойчивы к действию β -лактамов, макролидов и цефалоспоринов [Stock et al., 2003].

Существует три наиболее изученных механизма появления антибиотикоустойчивости: модификация внутриклеточной мишени антибиотика или самого антибиотика, например, в случае антибиотиков из класса аминогликозидов [Shaw et al., 1993]; уменьшение экспрессии белков-поринов, что предотвращает попадание антибиотиков класса β -лактамов в клетки бактерий [Jaffe et al., 1982] и мутации в генах гиразы, уменьшающие чувствительность бактерий к антибиотикам класса фторхинолонов [Heisig, 1993]. Тем не менее, наиболее эффективным способом возникновения антибиотикоустойчивости у грамотрицательных микроорганизмов является четвертый механизм: быстрая активация эффлюкс систем, осуществляющих активный экспорт антибиотиков из клетки [Oethinger et al., 2000].

В клетках *S. marcescens* в настоящее время охарактеризованы 6 эффлюкс систем [Марданова с соавт., 2014]. Проведенный биоинформационный анализ геномной последовательности *S. marcescens* позволил выявить новую эффлюкс систему ABC-типа. Эта система не изучена у представителей рода *Serratia*, но гомологична MacAB системе *E. coli*, защищающей клетки от эритромицина и других антибиотиков класса макролидов [Kobayashi et al., 2001].

Таким образом, актуальной задачей является изучение новых эффлюкс систем *S. marcescens*, выяснение их роли в антибиотикоустой-

чивости, что может послужить базой для создания новых эффективных способов борьбы с этим патогеном. В связи с этим целью данной работы является изучение роли эффлюкс-системы MacAB в защите *S. marcescens* от антибиотиков.

Наиболее продуктивным методом анализа микробных генов с известной функцией является их инактивация (нокаутирование) с последующим изучением фенотипов мутантных клеток. Эффективный и быстрый способ инактивации генов при помощи метода ПЦР и системы рекомбинации фага λ -ред был разработан для близкородственной бактерии *E. coli* [Datsenko, Wanner, 2000]. Используя данную методику, а также метод трансдукции при помощи бактериофага ФОТ8, нами был получен мутантный штамм клинического изолята *S. marcescens* SR41-8000 с инактивированным геном эффлюкс-системы MacAB (далее *S. marcescens* SR41-8000 Δ macAB).

Следующим этапом работы стало качественное определение антибиотикоустойчивости штаммов *S. marcescens* SR41-8000 и SR41-8000 Δ macAB диско-диффузионным методом (ДДМ). В ДДМ в качестве носителя антибактериального препарата (АБП) используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста микроорганизмов, посеянных на поверхности агара, происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна минимальной ингибирующей концентрации антибиотика (МИК).

Для определения чувствительности ДДМ использовали агаризованную (2%) питательную среду LB. Использовались коммерческие стандартизированные диски (производство ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург). При определении чувствительности ДДМ использовали бактериальную суспензию ночной культуры, с плотностью 0.5 единиц по стандарту Мак-Фарланда [МУК 4.2.1890-04; 2004].

Инокуляцию приготовленных чашек проводили внесением бактериальной суспензии на поверхность агара в объеме 100 мкл, после чего равномерно распределяли ее с помощью шпателя Дригальского. Не позднее чем через 15 мин после инокуляции на поверхность пи-

тательной среды с помощью стерильного пинцета наносили диски с АБП. После аппликации дисков чашки инкубировали при температуре 37 °C в течение 18–24 ч.

Учет результатов проводили при измерении зон полного подавления видимого роста [МУК 4.2.1890-04; 2004]. Результаты эксперимента представлены в таблице 1. В ходе экспериментов выявлено, что для фторхинолонов I поколения (ципрофлоксацин) и цефалоспоринов I поколения (цефазолин) отмечено уменьшение диаметра зоны подавления роста у мутантного штамма *S. marcescens* SR41-8000ΔmacAB. Это может объясняться наличием у *S. marcescens* нескольких эффлюкс систем. Благодаря разнообразию эффлюкс систем, дополняющих друг друга, *S. marcescens* способна выводить из клетки широкий спектр антибиотиков [Kobayashi et al., 2001]. Кроме того, в экспериментах с *E.coli*, проводимых группой K. Nishino, показано, что при инактивации одной из эффлюкс систем, увеличивается экспрессия генов, кодирующих другие эффлюкс системы [Nishino et al., 2009]. По данным литературы, штаммы *S. marcescens* являются устойчивыми к нитрофурантоину и имеют переходную устойчивость к аминогликозидам [Mahlen, 2011]. Исходя из данных таблицы видно, что штамм *S. marcescens* SR41-8000ΔmacAB стал, по сравнению с переходным по чувствительности диким типом, чувствительным к таким АБП, как канамицин, гентамицин, которые относятся к классу аминогликозидов I и III поколения, соответственно. Такая же реакция штаммов была замечена по отношению к нитрофурантоину, относящегося к классу нитрофуранов.

По данным литературы, MacAB эффлюкс система *E. coli*, защищает клетки от антибиотиков класса макролидов [Kobayashi et al, 2001]. Наши эксперименты показали, что инактивация эффлюкс системы MacAB *S.marcescens* не оказывала влияния на чувствительность бактерий к антибиотикам класса макролидов. Вместо этого нами показано, что в отличие от эффлюкс системы *E. coli*, ее гомолог в *S. marcescens* защищает бактерии от аминогликозидов и нитрофуранов.

Таким образом, эффлюкс система MacAB *Serratia marcescens* защищает бактерии от антибиотикам класса аминогликозидов I и III поколения и нитрофуранов.

Таблица 1

Чувствительность к антибактериальным препаратам
штаммов *Serratia marcescens*

Группа АБП	АБП	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм (± 0.5 мм)		Чувствительность	
			SR41-8000	SR41-8000Δ macAB	SR41-8000	SR41-8000Δ macAB
аминогликозиды I поколения	канамицин	30	16	19	П	Ч
	неомицин	30	13	23	П	Ч
аминогликозиды II поколения	гентамицин	10	14	16	П	Ч
аминогликозиды III поколения	амикацин	30	28	26	Ч	Ч
макролиды	klarитромицин	15	13	13	У	У
нитрофураны	нитрофурантоин	300	15	21	П	Ч
нитрофураны	фурагин	300	17	10	–	–
оксихинолины	нитроксолин	20	20	22	–	–
п/синт. пенициллины	ампициллин	10	22	23	Ч	Ч

Окончание табл. 1

тетрациклины	доксциклин	30	19	20	Ч	Ч
фторхинолоны I поколения	ципрофлоксацин	5	37	27	Ч	Ч
хинолоны	налидикс. кислота	30	27	29	Ч	Ч
цефалоспорины I поколения	цефазолин	30	14	0	У	У
цефалоспорины III поколения	цефтазидим	30	29	33	Ч	Ч
	цефотаксим	30	32	36	Ч	Ч

Ч — чувствительный, П — переходная чувствительность, У — устойчивый; «—» — нет

АНАЛИЗ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА MVA ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН БЕЛКА NS1 ПАРВОВИРУСА

А. В. Ткачёва, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева, Г. В. Кочнева

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

Онкологические заболевания являются одной из основных причин заболеваемости и смертности во всем мире. Существующие методы терапии опухолей характеризуются низкой эффективностью в плане предупреждения прогрессирования заболевания и побочными эффектами на организм больного. В настоящее время особенно актуальными являются работы по разработке противоопухолевых препаратов с многофункциональным механизмом действия в связи с колоссальным многообразием типов опухолей, нестабильностью либо отсутствием иммунного ответа на раковые

клетки и появлением иммунодефицитных состояний при онкологических заболеваниях.

Использование онколитических вирусов — это новый подход в терапии онкологических заболеваний, основанный на естественной способности вирусов лизировать клетки, в которых он размножается.

Терапия с применением онколитических вирусов имеет ряд преимуществ перед стандартными методами противораковой терапии. Во-первых, вирусы могут быть быстро модифицированы с применением технологии рекомбинантных ДНК. Таким образом, можно быстро внедрять интенсивно появляющиеся новые знания о клеточных сигнальных путях в процессе создания онколитических вирусов. Во-вторых, непатогенные или аттенуированные природные и рекомбинантные вирусы имеют механизмы распознавания раковых клеток и обладают избирательным цитолитическим потенциалом. Также показано, что виротерапия эффективна при лечении метастазирующих опухолей, которые являются неоперабельными и/или плохо поддаются радиотерапии и обычной химиотерапии.

В настоящее время наряду с другими вирусными семействами значительное внимание уделяется использованию потенциальных возможностей вирусов семейства *Poxviridae* в борьбе с онкологическими заболеваниями. Наиболее изученным среди онколитических поксвирусов является вирус осповакцины.

Многочисленные природные свойства вируса осповакцины делают его перспективным онколитическим вирусом. Вирус осповакцины:

- реплицируется и лизирует раковые клетки с высокой скоростью;
- обладает тропизмом к широкому кругу клеток, для его проникновения не требуется определенных клеточных рецепторов и инфицирование происходит эффективно путем слияния клеточной и вирусной мембран, что увеличивает эффективность заражения *in vivo*;
- реплицируется в цитоплазме в специфических структурах, так называемых вирусных фабриках, и никогда не интегрирует свой геном в геном хозяина;
- имеет большой размер генома, что позволяет встраивать до 25000 пар оснований чужеродной ДНК, не нарушая инфекционности вируса;

– способен системно распространяться по организму человека, что обеспечивает его эффективную доставку к отдаленным опухолям и метастазам;

– генетически стабилен и имеет низкую скорость спонтанного мутагенеза.

Однако вирус осповакцины является инфекционным для человека, и иногда, после вакцинации, проводимой в качестве профилактической меры по борьбе с натуральной оспой, у вакцинированных людей наблюдались серьезные осложнения. Риск для здоровья человека или животных, связанный с применением данного вируса в качестве вектора, может быть снижен путем использования высокоаттенуированного (ослабленного) штамма вируса осповакцины.

MVA (modified vaccinia virus Ankara) является высокоаттенуированным вариантом вируса осповакцины за счет того, что имеет делеции большого количества факторов вирулентности. В 2010 году MVA был одобрен в США и европейских странах как противооспенная вакцина для предотвращения и ликвидации последствий возможных террористических атак или других случаев угрозы натуральной оспы.

Для усиления адресности и противоопухолевых свойств MVA необходима реконструкция генома. Одним из перспективных трансгенов для повышения онколитической активности вирусов является первый неструктурный белок NS1 парвовируса крыс H-1. Белок NS1 является главным фактором, ответственным за специфическую онколитическую активность парвовирусов, и способен индуцировать апоптоз раковых, но не нормальных клеток человека. Показано, что белок NS1 парвовируса особенно эффективен в отношении клеток глиом человека, которые наиболее трудно поддаются лечению стандартными методами противораковой терапии.

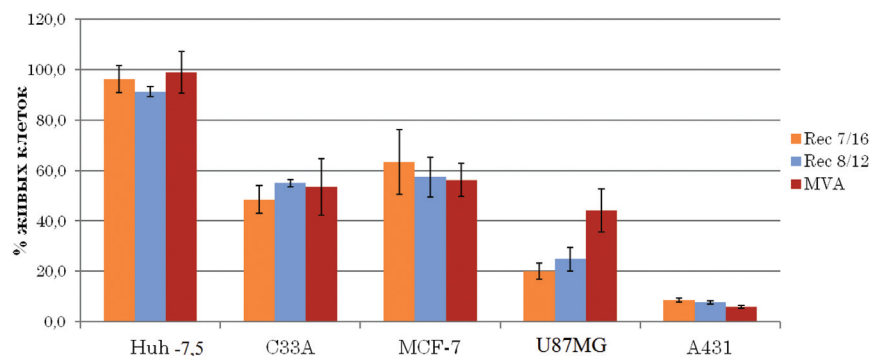
В процессе работы был получен рекомбинантный вирус на основе штамма MVA вируса осповакцины со встройкой гена апоптоз-индуцирующего белка NS1 парвовируса H-1. Наличие встройки было подтверждено методом ПЦР и секвенирования. Методом Вестерн-блоттинга показано, что происходит экспрессия гена NS1. Исследование цитолитической активности вируса MVA и его рекомбинант-

ных вариантов проводилось на панели опухолевых клеток человека разного тканевого и органного происхождения с использованием реагента ХТТ.

Использовали панель опухолевых клеток человека различного генеза:

- 1) Huh-7.5 — клетки гепатомы человека
- 2) C33A — клетки рака шейки матки человека
- 3) MCF-7 — клетки аденокарциномы молочной железы человека
- 4) U87MG — клетки глиобластомы человека
- 5) A431 — клетки эпидермоидной карциномы человека

Результаты оценки цитотоксической активности штаммов вируса осповакцины с использованием реагента ХТТ представлены на рисунке.



Как следует из представленной диаграммы, рекомбинантные варианты вируса MVA со встройкой гена белка NS1 имеют достоверно (на уровне значимости 95%) большую цитотоксическую активность для клеток глиобластомы человека U87MG по сравнению с исходным родительским штаммом. Из диаграммы также видно, что для остальных культур клеток онколитическая активность рекомбинантных вариантов вируса не отличается достоверно от онколитической активности вируса дикого типа.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОМУ БЕЛКУ PMEPA1 И АНАЛИЗ ХАРАКТЕРА ЕГО ЭКСПРЕССИИ В ТКАНИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА *

В. В. Волкоморов^{1,2}, Е. С. Григорьева^{1,2}, М. С. Карбышев³,
И. В. Митрофанова^{1,2}, Е. В. Кайгородова^{1,2}, Н. В. Чердынцева^{1,2}

¹ Томский НИИ онкологии, г. Томск, ² Национальный
исследовательский Томский государственный университет,
г. Томск, ³ Международный биотехнологический центр «Генериум»,
Владимирская обл.

Актуальность исследования. Сигнальный путь TGF- β играет ключевую роль в процессах клеточного роста, дифференцировки, апоптоза, вовлечен в регуляцию иммунного ответа, формирование злокачественных опухолей и их метастазирование. Одним из белков, чья экспрессия непосредственно индуцируется в результате активации TGF- β сигнального пути, является PMEPA1 (Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1). Данный белок непосредственно связываться с молекулами R-Smad (Smad 2 и 3), которые являются посредниками в передаче сигнала от молекулы рецептора TGF- β в ядро, тем самым блокируя трансдукцию сигнала. Анализ имеющихся в литературе данных о функции белка PMEPA1 определил его важное значение в процессах пролиферации и дифференцировки ряда тканей эпителиального происхождения, что позволило говорить о роли PMEPA1 в развитии злокачественных новообразований различных локализаций. Существующие разрозненные данные свидетельствуют в пользу весьма неоднозначной роли данного белка в онкогенезе, требующей более детального уточнения. На собственной коллекции парных образцов нормальной и опухолевой ткани нами была показана повышенная экспрессия гена *PMEPA1* в ткани аденокарциномы желудка интести-

* Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ мол_а №14-04-31500\15 от 30.04.2015.

нального гистологического типа. Проведенные нами предварительные исследования его белкового продукта показали неэффективность использования ряда коммерческих антител для его детекции в экстрактах тканей и на гистологических срезах. Это обусловило актуальность получения собственных высокоспецифичных антител к РМЕРА1, с последующим анализом их специфичности и оценкой экспрессии данного белка в ткани аденокарциномы желудка.

Материал и методы. Получение моноклональных антител (мкАТ). В качестве антигена при иммунизации крыс использовался синтетический пептид 275WSKEKDKQKGHPL287, конъюгированный с овальбумином (PSL, Германия). Гибридизация лимфоцитов проводилась по стандартной методике. мкАТ, показывающие специфическую активность против РМЕРА1, подвергались дальнейшему анализу с помощью иммуноблота. Очистку полученных мкАТ проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке HiTrap MabSelect (GE Healthcare).

Получение рекомбинантного белка РМЕРА1 в культуре клеток линии НЕК293Т. Полноразмерный ген РМЕРА1 амплифицировали с использованием специфических праймеров, в состав которых вводили сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции NheI и EcoRI и клонировали в плазмиду pIRES-EGFP (Clontech, США). Трансфекция проводилась кальций-фосфатным методом. **Иммуноблоттинг.** Клеточные лизаты подвергали электрофоретическому разделению по методу Лэммли в полиакриламидном геле. После разделения белки подвергали электропереносу на поливинил-дифторидную мембрану Immobilon-P Transfer Membrane (Millipore, США), используя Mini Trans-Blot transfer cell (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. При исследовании образцов специфическую реакцию определяли на пленке для выявления хемотропной флуоресценции с помощью ECL Plus Western Blotting Detection System.

Иммуноцитохимическое исследование. Способность полученных мкАТ к связыванию белка РМЕРА1 была проанализирована с помощью иммуноцитохимии на трансфицированных клетках линии НЕК293Т. В качестве вторичных антител использовали овечьи антитела к IgG кролика, конъюгированные с родамином в разведении 1:300.

Иммуногистохимическое исследование. В качестве материала для тестирования использовали срезы тканей рака простаты 2 пациентов. Операционный материал фиксировали 10% формалином, забуференным фосфатным буфером в течение 24 ч. Связавшиеся антитела выявляли, используя козы антитела против первичных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:100.

Результаты. Основной белковый продукт гена *PMEPA1* содержит 287 аминокислотных остатков, являясь самой длинной формой, состоит из экстрацеллюлярного домена (40 аминокислот), трансмембранного домена (28 аминокислот) и длинного цитоплазматического «хвоста» (227 аминокислот). Для получения специфичных к *PMEPA1* мкАТ нами был выполнен поиск участков локализации антигенных детерминант, топологически наиболее доступных для взаимодействия антител с выявленным мембранным белком. В качестве антигена использовался синтетический пептид 275WSKEKDKQKGHP1287, представляющий собой С-концевую цитоплазматическую часть белка *PMEPA1*.

Способность полученных антител распознавать целевой белок в клетках линии НЕК293Т, транзистентно экспрессирующих *PMEPA1*, оценивали с помощью метода вестерн-блота и иммуноцитохимии. Клетки трансфицировали экспрессионным вектором pIRES-EGFP, содержащим вставку, кодирующую полноразмерный белок *PMEPA1*. При проведении иммуноцитохимического исследования визуализацию проводили с помощью антивидовых конъюгатов, меченных родамином. Полученные антитела выявляли цитоплазматическую локализацию белка *PMEPA1*. Трансфицированные клетки, содержащие генетическую конструкцию pIRES-EGFP-*PMEPA1*, характеризовались более высоким уровнем флуоресценции, по сравнению с нетрансфицированными контрольными клетками. Для оценки специфичности и пригодности применения полученных мкАТ для детекции *PMEPA1* в клинических образцах нами был использован иммуногистохимический анализ срезов ткани из парафиновых срезов. В качестве положительного контроля была выбрана нормальная ткань простаты. Наблюдалась выраженная ядерно-цитоплазматическая экспрессия *PMEPA1*.

Определение характера экспрессии РМЕРА1 с помощью полученных мкАТ в парных клинических образцах больных аденокарциномой желудка методом вестерн-блот анализа показало значительное снижение содержания белка в опухолевой ткани по сравнению с соответствующей нормой. Чтобы установить возможность использования полученных АТ для выявления РМЕРА1 в опухолевых тканях, была проведена оценка экспрессии белка на срезах нормальной ткани и аденокарциномы желудка. Выявляемая ядерно-цитоплазматическая экспрессия РМЕРА является характерной и для некоторых других белков, имеющих в своей структуре мотивы, взаимодействующие с WW-доменами убиквитин лигазы Nedd4. Для оценки роли РМЕРА1 в патогенезе рака желудка был проведен анализ его экспрессии в опухолевой ткани *in situ* в образцах аденомы, аденокарциномы и нормального эпителия желудка. В результате нами обнаружена высокая экспрессия РМЕРА1 в нормальной слизистой желудка, однако при оценке препаратов аденомы и аденокарциномы желудка, клетки, содержащие белок РМЕРА1 не были выявлены. При этом важным является тот факт, что клетки эпителия желудка теряют экспрессию РМЕРА1 с момента возникновения морфологических признаков тяжелых диспластических изменений.

Заключение. Нами получено новое моноклональное антитело против опухоли-ассоциированного белка РМЕРА1, вовлеченного в TGF- β сигнальный путь, играющего важную роль в процессе метастазирования злокачественных опухолей. Полученные мкАТ обладают достаточной чувствительностью для детекции РМЕРА1 в клиническом материале и выявления особенностей его экспрессии в различных тканях. Проведенный анализ экспрессии РМЕРА1 в клинических образцах желудка и в ткани *in situ* позволяет говорить о возможности использования данного белка в качестве маркера риска злокачественной трансформации эпителия желудка. При этом феномен несоответствия транскрипционного и трансляционного уровня экспрессии гена *РМЕРА1* требует более детального изучения и выяснения механизмов данного явления.

РОЛЬ БЕЛКА KU В ИНГИБИРУЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ДНК НА ДЦРНК-ЗАВИСИМУЮ АКТИВАЦИЮ NF-kB В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

А. В. Черепанова, В. В. Власов, П. П. Лактионов

*Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

Одним из перспективных направлений в противоопухолевой терапии является регуляция опухолеассоциированного воспаления путем воздействия на паттерн-распознающие рецепторы. В частности, было показано, что дцРНК и ее синтетический аналог poly(I:C) — лиганды рецепторов TLR3, RIG1 and MDA5, активируют апоптоз в опухолевых клетках. Однако взаимодействие дцРНК с TLR3 также приводит к активации транскрипционного фактора NF-kB, что может усиливать воспаление вокруг опухоли, активировать пролиферацию опухолевых клеток, ангиогенез и метастазирование. Таким образом, специфические ингибиторы NF-kB после активации TLR3 позволили бы повысить эффективность дцРНК в противоопухолевой терапии.

Ранее в нашем исследовании было показано, что ДНК и ОДН специфической последовательности ингибируют poly(I:C)-индуцированную продукцию провоспалительных интерлейкинов в первичных фибробластах и эндотелиоцитах человека (Черепанова et al, Immunobiology, 2013). Методом аффинной модификации/выделения с последующей масс-спектрометрией в качестве основной клеточной мишени иммуноингибирующих ОДН был идентифицирован белок Ku (гетеродимер Ku70 и Ku80) (Черепанова et al, Exp. Opin. Biol. Ther., 2012). В задачи этого исследования входило выяснить ингибируют ли ОДН poly(I:C)-индуцированную активацию опухолевых клеток (карциномы шейки матки Hela и эпидермальной карциномы A431), а также участвует ли белок Ku в наблюдаемом эффекте.

Показано, что poly(I:C) активирует продукцию ИЛ-6 в клетках Hela и A431, а специфические ОДН, как и в первичных клетках, ингибируют эту активацию. При этом ОДН снижают как концентрацию ИЛ-6 в клеточном супернатанте, так и уровень экспрессии мРНК в poly(I:C)-активированных клетках, что свидетельствует об ингибировании активации NF- κ B.

Для того, чтобы выяснить роль Ku-комплекса в реализации иммуносупрессирующего действия ОДН, было использовано ингибирование экспрессии Ku70 под действием siРНК, которые снижают уровень экспрессии Ku70 в мембранно-цитозольной фракции клеток на 60–65%. Эффективность ингибирования ОДН в 1,7 раз ниже, в клетках, предварительно трансфицированных Ku70 siРНК, по сравнению с контрольной siРНК. Таким образом, взаимодействие Ku70 с иммуноингибирующими ОДН в клетках, по-видимому, необходимо для ингибирования poly(I:C)-индуцированной продукции провоспалительных интерлейкинов. Дальнейшие исследования покажут, вовлечен ли белок Ku напрямую во взаимодействие нуклеиновых кислот с паттерн-распознающими рецепторами, или выполняет вспомогательную функцию, регулируя локализацию ОДН в клетке или взаимодействие poly(I:C) с другими белками. Так или иначе, ингибирование NF- κ B специфическими ОДН может повысить эффективность дцРНК в противоопухолевой терапии.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ ПАЦИЕНТОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Ю. Б. Дорофеева¹, И. В. Салтыкова¹, В. А. Петров¹,
С. В. Федосенко¹, Л. М. Огородова¹, А. С. Попенко², А. В. Тяхт²,
Н. А. Кириллова¹, Е. С. Куликов¹, И. А. Деев¹, В. М. Говорун^{2,3},
Е. С. Кострюкова^{2,3}

*¹ ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет
Минздрава России, г. Томск, ² ФГБУН «Научно-исследовательский
институт физико-химической медицины» ФМБА Российской
Федерации, г. Москва, ³ ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский)
федеральный университет*

Бронхиальная астма (БА) и хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), — наиболее распространенные хронические заболевания органов дыхания у взрослых, приводящие к существенному снижению качества жизни, ранней инвалидизации и высокой смертности больных.

В наши дни человеческий организм принято рассматривать в свете симбиотических отношений с населяющим его сообществом микроорганизмов, появляется все больше информации об изменении состава микробиоты человека при различных заболеваниях и ее роли в патогенезе различных расстройств. Ранее микробиота дыхательных путей при БА и ХОБЛ уже была охарактеризована, но не проводилась ее сравнительная характеристика.

В исследование были включены 138 пациентов с БА и ХОБЛ. Для получения микробиоты были забраны орофарингеальные мазки, по которым оценивался видовой состав путем секвенирования по переменным регионам V3-V4 последовательности генов 16S рНК на приборе Illumina MiSeq.

Фильтрация ридов по качеству и их классификация по таксонам были выполнены при помощи программного обеспечения QIIME, в качестве референсной базы данных послужила Greengenes версии V13.5. Для статистического анализа был применен пакет *metagenomeSeq* языка R.

В ходе исследования было выяснено, что наиболее представленными родами метагеномных сообществ со значениями 10 % и более, как для пациентов с БА, так и для групп больных с ХОБЛ, являются *Streptococcus*, *Prevotella* и *Veillonella*. Среди преобладающих микроорганизмов, составляющих от 2 до 10 % микробиоты, в образцах больных ХОБЛ следует выделить роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Porphyromonas*, а в образцах пациентов с БА — роды *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Porphyromonas*, *Haemophilus*, *Actinomyces*, *Rothia* и *Actinobacillus*.

Так же в ходе исследования обнаружено преобладание у больных ХОБЛ с 1–2 степенью тяжести над пациентами с легкой (контролируемой и частично контролируемой) БА бактерий родов: *Mycoplasma*, *Actinomyces*, *Bordetella*, *Aggregatibacter*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Catonella*, *Alloiococcus*, *Peptoniphilus*, *Sediminibacterium*. Тогда как у больных с легкой персистирующей БА более высокой, чем у пациентов с 1–2 степенью тяжести ХОБЛ оказалась представленность рода *Selemonas*, *Granulicatella* и *Gemella*.

В то же время у больных тяжелой неконтролируемой БА и ХОБЛ тяжелого и очень тяжелого течения (3–4 степени тяжести) статистически значимые различия в составе микробиоты не выявлены, что позволяет предположить схожий характер активности иммунной системы при тяжелых стадиях патологий.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ NEDD9 В ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И ОПУХОЛЕВОМ МИКРООКРУЖЕНИИ НА РАЗВИТИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Р. Габбасов^{1,2}, Л. Бикл², Ш. О'Брайн²,
С. Сiao³, С. Литвин², Э. Големис²,
Э. Бабынин¹, Д. Конолли²

¹ ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; ² Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США;

³ Университет Токио, Токио, Япония.

Повышенная экспрессия белка NEDD9 (Neural precursor cell Expressed, Developmentally Downregulated 9) связана с рядом онкологических заболеваний, однако о роли NEDD9 в развитии эпителиального рака яичников (ЭРЯ) известно мало. ЭРЯ — наиболее опасный рак женской половой системы, занимающий пятое место среди причин онкологической смертности российских женщин. Обычно ЭРЯ развивается бессимптомно, и на момент диагностики пациентка имеет множественные метастазы в перитонеальной полости. В связи с этим, поиск новых диагностических маркёров и мишеней для химиотерапии — приоритетное направление борьбы с ЭРЯ.

Цель исследования — определить влияние экспрессии NEDD9 на развитие ЭРЯ. Для достижения поставленной цели, ЭРЯ моделировался путём имплантации клеток рака яичника мыши (MOVCAR) в яичники мышей линии *MISIIR-TAg-low*. В задачи исследования входило определить, зависит ли развитие ЭРЯ от экспрессии NEDD9 1) в первичной опухоли и 2) в опухолевой микросреде.

Для решения первой задачи, мы провели серию из 3-х имплантаций *Nedd9^{+/+}* клеток линии MOVCAR 5009 в яичники *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* мышей (общее n мышей каждого генотипа = 30). В результате, не было обнаружено значимых различий у *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* мышей в скорости роста опухолей, количестве сопровождавших их метастазов и частоте появления асцитов.

Для решения второй задачи, мы имплантировали *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}* MOVCAR клетки в яичники *Nedd9^{+/+}* мышей, смоделировав делецию *Nedd9* в первичной опухоли в организме с неизменённым генотипом. В 3-х независимых экспериментах использовали 6 клеточных линий (*Nedd9^{+/+}*: MOVCAR 5009, 6111, 8248; *Nedd9^{-/-}*: MOVCAR 136, 145, 168), каждую из которых имплантировали в 10 мышей. Отсутствие внутриопухолевой экспрессии NEDD9 привело к снижению скорости роста опухолей (74 ± 2 и 102 ± 7 дня; $p < 0,0001$; здесь и далее показаны средние $\pm$ SEM для опухолей с генотипами *Nedd9^{+/+}* и *Nedd9^{-/-}*, соответственно), уменьшению количества метастазов в перитонеальной полости ($69,0 \pm 3,7$ против $30,7 \pm 4,3$; $p < 0,001$) и уменьшению частоты появления асцитов (100 % против 68 %, $p < 0.0001$).

Результаты исследования указывают на то, что: а) экспрессия NEDD9 ускоряет рост и распространение ЭРЯ, б) принципиально возможно использовать NEDD9 и/или связывающихся с ним белки в качестве мишеней для химиотерапии ЭРЯ, и в) NEDD9 не подходит на роль диагностического маркера ЭРЯ.

СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМой

А. Е. Григорьева¹, С. Н. Тамкович¹, М. Р. Кабилов¹, А. В. Еремина²

¹ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины, ² Новосибирский филиал МНТК «Микрохирургия глаза»

Цели и задачи. Глаукома — это комплексное заболевание со сложным патогенезом и невыясненной этиологией, при котором происходят патологические изменения оптического диска. Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ), самая распространенная разновидность глаукомы, занимает одно из первых мест среди причин неизлечимой слепоты и имеет важнейшее социальное значение. Анализ механизмов развития глаукомы осложняются тем, что ткани, подверженные

патологическим изменениям находятся внутри глазного яблока и, соответственно, недоступны для прямого исследования без повреждения структур органа зрения. Слезная жидкость (СЖ) — единственный доступный субстрат для анализа, сбор которой безопасен для пациента. СЖ — это интерфейс, через который передний отдел глаза взаимодействует с внешней средой, состав слезной жидкости определяется состоянием всех тканей органа зрения и влиянием внешней среды, и может служить надежным индикатором патологических процессов.

В СЖ присутствуют внеклеточные везикулы, включая экзосомы, и микрочастицы — компактные агрегаты макромолекул. Обе группы частиц присутствуют во всех биологических жидкостях и не выделяются одна без другой. Образцы внеклеточных везикул, выделенные из СЖ, содержат многочисленные маркеры, исследование и характеристика которых может помочь в понимании патогенеза ПОУГ и предсказании развития данного заболевания. Цель данного исследования: выделить и исследовать образцы внеклеточных везикул больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) и сравнить их с образцами здоровых людей.

Материалы и методы. Описанным ранее способом собирали образцы СЖ у 33 больных ПОУГ (45–60 лет, 22 женщины и 11 мужчин) из которых у 16 пациентов была начальная стадия ПОУГ (ПОУГ I), у 10 — развитая (ПОУГ II) и у 7 — далеко зашедшая (ПОУГ III). В качестве группы сравнения использовали 29 образцов СЖ людей без офтальмологических заболеваний. Образцы СЖ центрифугировали для осаждения клеточного дебриса, 20 мкл полученного супернатанта СЖ использовали для электронно-микроскопического исследования, оставшийся — для выделения экзосом и микрочастиц.

Для выделения экзосом и микрочастиц супернатант СЖ подвергали ультрафильтрации и двойному ультрацентрифугированию. Данный препарат в дальнейшем именуется «экзосомы», в отличие от супернатанта СЖ.

Образцы изучали методом негативного контрастирования в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Japan) с цифровой фотокамерой Veleta (SIS, Germany). Размер частиц измеряли

непосредственно на экране камеры, используя пакет программ iTEM (Olympus SIS, Germany). В 18 образцах супернатанта больных ПОУГ I и II измерен диаметр случайно выбранных 970 структур и обнаружено, что соответственно и 69% из них были везикулами, размером 40–100 нм. В 15 образцах супернатанта здоровых людей измерено 770 структур, 72% из них имели размер 40–100 нм.

Концентрацию экзосомной ДНК СЖ определяли с помощью М-ПЦР-РВ. Выделенную из образцов ДНК инкубировали с РНКазой А, концентрировали переосаждением и фрагментировали с помощью Covaris S2 (Covaris). **Полученные фрагменты секвенировали на секвенаторе Genomics Core Facility on MiSeq (Illumina).**

Результаты и обсуждение. Везикулы являются обязательным компонентом любой биологической жидкости. СЖ не является исключением — в супернатантах СЖ содержится множество везикул. Везикулы имеют ограничивающую мембрану, обычно округлую или чашеобразную форму и размер 40–250 нм. Везикулы размером 40–100 нм по морфологии можно отнести к экзосомам. Образцы СЖ больных ПОУГ I и II и образцы здоровых людей содержат одинаковое количество везикул. Образцы СЖ больных ПОУГ III отличаются от других морфологией и концентрацией везикул — количество везикул меньше, некоторые везикулы покрыты «оболочкой» из материала низкой электронной плотности. Микрочастицы — компактные агрегаты макромолекул (20–40 нм), присутствуют в СЖ здоровых людей и больных ПОУГ. Исследование показало, что микрочастицы в образцах здоровых людей и больных ПОУГ ведут себя по-разному. В образцах здоровых людей микрочастицы не связаны друг с другом или другими белками, в то время как в образцах больных ПОУГ микрочастицы часто образуют крупные комплексы друг с другом или же с белковыми агрегатами.

Доля микрочастиц (20–40 нм) в образцах как больных ПОУГ, так и здоровых людей составляла в среднем 20%. Никаких статистически значимых отличий в размерных характеристиках везикул и микрочастиц между группами супернатантов СЖ не наблюдалось.

Ультрафильтрация и двойное ультрацентрифугирование супернатантов СЖ обеспечивают элиминацию частиц размером больше

100 нм, однако, не влияют на морфологию остальных везикул и микрочастиц. Стоит отметить, что в образцах «экзосом» больных ПОУГ III были обнаружены везикулы с оболочкой из материала низкой электронной плотности, как и в образцах супернатантов. Так же доля микрочастиц в образцах «экзосом» уменьшается и составляет у больных ПОУГ в среднем 10 %, у здоровых людей — 15 %. Тем не менее, никаких статистически значимых отличий в размерных характеристиках частиц в образцах экзосом здоровых людей и больных ПОУГ обнаружено не было.

Было показано, что концентрация ДНК в образцах больных ПОУГ сильно варьирует. У некоторых больных она на порядок выше, чем в образцах здоровых людей, а у других — ниже. Образцы больных ПОУГ с самой высокой концентрацией ДНК содержат фрагменты бактериального генома. Эти данные согласуются с недавно выдвинутой теорией, что на развитие глаукомы оказывают влияние микроорганизмы.

В работе показано присутствие экзосом в СЖ больных ПОУГ и проведено сравнение их свойств с экзосомами СЖ здоровых людей. Экзосомы и микрочастицы супернатантов больных ПОУГ I и ПОУГ II не отличаются друг от друга по морфологическим характеристикам, тогда как образцы больных ПОУГ III имеют ряд особенностей, которые явно выделяют их среди остальных образцов. Образцы больных ПОУГ так же отличает вариабельность концентрации ДНК. Таким образом, состав СЖ меняется на субклеточном и молекулярном уровне в процессе развития глаукомы, и СЖ предстает как перспективный источник диагностических маркеров офтальмологических заболеваний, требующий дальнейших тщательных исследований.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ДНК В РАЙОНЕ ЛОМКОГО САЙТА FRAHA У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ MARTINA-BELL

*И. В. Грищенко¹, А. А. Дольский¹, С. В. Кулемзин³,
В. О. Пустыльяк⁴, К. Усдин², Д. В. Юдкин^{1,3}*

*¹ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск,
² The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases,
Bethesda, United States, ³ Институт молекулярной и клеточной
биологии СО РАН, г. Новосибирск, ⁴ ГУ Научно-исследовательский
институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН*

Экспансия повторенных микросателлитных последовательностей это особый тип мутаций, который заключается в резком увеличении количества повторов на сотни и даже тысячи единиц. Это явление приводит к ряду генетических заболеваний человека таких, как болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, прогрессирующая миоклоническая эпилепсия и др. На сегодняшний день причина развития этой мутации неизвестна. Согласно одной из теорий, объясняющих это явление, экспансия связана с образование термодинамически устойчивых вторичных структур ДНК, обогащенных гуанином — G-квадруплексов. На участках с этими структурами происходит сбой работы систем репарации, а также ДНК-полимераз, что приводит к нарушению репликации и к резкому увеличению размера повтора.

Одним из распространенных заболеваний, связанных с экспансией является синдром Мартина-Белл (синдром ломкой X-хромосомы). Он обусловлен экспансией повтора CGG в промоторной области гена FMR1. Данное заболевание приводит к развитию у пациентов наследственной умственной отсталости, аутизму, эпилепсии, расстройствам речи и некоторым физическим аномалиям. Количество этих повторов в норме варьирует от 5 до 54 единиц, синдром развивается при количестве повторенных триплетов более 200.

В 2013 году в Кембриджском университете был сконструирован scFv-фрагмент антитела специфичный к G-квадруплексам. Авторы подтвердили его сродство к этим структурам на геномной ДНК на фиксированных препаратах фибробластов человека.

Цель нашей работы — показать возможность формирования G-квадруплексов в районе вероятной экспансии повторов в живой клетке, а так же подтвердить высокую степень сродства scFv к этим вторичным структурам *in vitro*.

Работа была проведена на культурах иммортализованных В-лимфоцитов пациентов (gm04025, gm06897) и контрольных клеточных линиях (gm06895), полученных из клеточного банка Института Кориелла (США).

В ходе исследования нами проведена колокализация сигналов антител и ВАС клона (RP11-489K19), содержащего полную копию гена FMR1 на фиксированных препаратах ядер и метафазных хромосом клеток пациентов и контрольных линий.

ИНТЕГРАТИВНАЯ И ЭПИСОМАЛЬНАЯ ФОРМЫ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ГЕНОТИПА В ИЗМЕНЕННОМ ЦЕРВИКАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ *

М. К. Ибрагимова^{1,2}, М. М. Цыганов^{1,2}, И. В. Карабут¹

¹ *Томский НИИ онкологии, г. Томск, Россия,* ² *Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск, Россия*

Актуальность. В инфицированной клетке вирус папилломы человека (ВПЧ) может существовать в эписомальной форме (вне хромосом клетки) — считается доброкачественной, интегрированной

* Работа поддержана грантом РФФИ 15-34-20568 «Изменение генетического ландшафта дисплазии в процессе злокачественной трансформации» и программой повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского государственного университета.

(встроенной в геном клетки) — расценивается как злокачественная форма персистирования вируса и смешанной форме (наличие свободного и встроенного в ДНК клетки-хозяина вируса). Прогрессия от клеточных изменений, связанных с ВПЧ-инфекцией, до развития рака шейки матки (РШМ) занимает около 10–40 лет, но редко может развиваться и за 1–2 года, что, несомненно, доказывает важность своевременного мониторинга больных папилломавирусной инфекцией и проведения вирусологических исследований для выявления групп риска развития онкологической патологии.

Целью настоящей работы явилось изучение частоты интегрированных форм ВПЧ 16 при предопухолевых и злокачественных патологиях шейки матки.

Материал и методы. Вирусологическое исследование было проведено 148 женщинам Томской области в возрасте от 20 до 76 лет, проходивших осмотр (условно здоровые женщины) и/или получавших лечение в Томском НИИ онкологии (с различными патологиями шейки матки). Все пациентки являлись носителями моноинфекции ВПЧ 16 генотипа. Материалом для исследования послужили соскобы эпителия цервикального канала и шейки матки. В зависимости от диагноза все пациентки были разделены на группы: 1 группа — условно здоровые женщины ($n=30$, средний возраст $30,1 \pm 1,6$), 2 группа — женщины с LSIL(CIN I) и HSIL (CIN II–III) эпителия шейки матки ($n=53$, средний возраст $38,5 \pm 0,8$), 3 группа — женщины с РШМ I–IV ($n=65$, средний возраст $44,3 \pm 1,2$). Всем пациентам было проведено определение физического статуса ДНК ВПЧ 16 типа. Выявление и оценка физического статуса генотипа ДНК ВПЧ 16 в ДНК клетки-хозяина проводилось с использованием набора реагентов фирмы «Amplisens®» (кат. номер R-V31-F) (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток. Согласно инструкции к наборам порог клинически значимой (высокой) вирусной нагрузки принимался равным $3 \lg$ ДНК ВПЧ / 10^5 клеток в соскобе. Выявление области E6 при отсутствии области E1/E2 интерпретировалось как интеграция вируса в ДНК человека, выявление области E6 при наличии области E1/E2 — как смешанная форма вируса, отсутствие области E6 при на-

личии области E1/E2 — как эписомальная форма вируса. Для оценки статистической значимости различий в распределении частот качественных признаков между группами использовали критерий Фишера. Подсчеты осуществляли на калькуляторе <http://vassarstats.net/odds2x2.html>. Для таблицы 2×3 был использован калькулятор http://gen-exp.ru/calculator_or.php.

Результаты и обсуждение. При сравнении частоты встречаемости клинически значимой вирусной нагрузки для выбранных ВПЧ16+ пациенток, было показано, что частота встречаемости высокой вирусной нагрузки у пациенток групп CIN II, всех больных и другими патологиями матки статистически значимо превышает частоту встречаемости высокой вирусной нагрузки для группы здоровых женщин (p от $1,98 \cdot 10^{-7}$ до 0.004 (табл.1)). Также было показано, что частота встречаемости высокой вирусной нагрузки у пациенток групп РШМ I-II, РШМ III-IV и общей группы с диагнозом РШМ (РШМ I-IV) статистически значимо превышает частоту встречаемости клинически значимой вирусной нагрузки для группы пациенток с CIN I (p от 0.001 до 0.01) (табл. 1).

Таблица 1

Вирусная нагрузка ВПЧ16 (моноинфекция)
у пациенток с патологией шейки матки

Всего 148 моноинфици- рованных ВПЧ16+ пациенток		Низкая вирусная нагрузка < 3 lg ДНК ВПЧ/10 ⁵ клеток	Высокая вирусная нагрузка > 3 lg ДНК ВПЧ/10 ⁵ клеток	p: OR (95CI%) OR-Odds Ratio (Отношение шансов)
Здоровые (n = 30)		21 (70,0 %)	9 (30,0 %)	—
LSIL (CIN I) (n = 6)		5 (83,3 %)	1 (16,7 %)	—
HSIL	CIN II (n = 16)	4 (25,0 %)	12 (75,0 %)	$p_1 = 0.004$, OR = 7.0 (1.8–27.7) $p_2 = 0.02$, OR = 15 (1.3–169.9)
	CIN III (n = 31)	2 (6,4 %)	29 (93,6 %)	$p_1 = 1,98 \cdot 10^{-7}$, OR = 33.83 (6.62–173.0) $p_2 = 0.0002$, OR = 72.5 (5.5–958.1)

Окончание табл. 1

Все больные CIN I-III (n = 53)	11 (20,8%)	42 (79,2%)	$p_1 = 0.00001$, OR = 8.91 (3.2–24.8) $p_2 = 0.004$, OR = 19.1 (2.0–180.7)
РШМ I-II (n = 20)	2 (10,0%)	18 (90,0%)	$p_1 = 0.00003$, OR = 21 (4.0–110.1) $p_2 = 0.001$, OR = 45 (3.4–604.0)
РШМ III-IV (n = 45)	8 (17,8%)	37 (82,2%)	$p_1 = 0.000008$, OR = 10.8 (3.6–32.1) $p_2 = 0.002$, OR = 23.1 (2.4–225.9)
Все больные РШМ I-IV (n = 65)	10 (15,4%)	55 (84,6%)	$p_1 = 2,7 \cdot 10^{-7}$, OR = 12.8 (4.6–36.0) $p_2 = 0.001$, OR = 27.5 (2.9–261)

Примечание: p_1 — различия статистически значимы по сравнению с группой здоровых лиц, p_2 — различия статистически значимы по сравнению с группой CIN I

Следующим этапом работы была оценка частоты интеграции ВПЧ 16 генотипа в ДНК на изучаемой выборке. Частота интегрированных форм составила: в группах с патологией шейки матки (CINI-III и РШМ I-IV) была в два раз выше, чем у условно здоровых (рис.1). Частота смешанных форм в группе РШМ I-IV была несколько выше, чем у здоровых и пациенток с дисплазией. Частота эписомальных форм ВПЧ снижалась по мере утяжеления диагноза и была равна 0 в группе РШМ I-IV. Статистически значимые различия по частоте встречаемости различных форм ВПЧ 16 в группах наблюдения на уровне $p < 0,002$ выявлены для эписомальной формы ВПЧ 16 типа в группе больных РШМ (по сравнению с группой здоровых лиц, OR(95CI%) = 1.2 (1.08 – 1.48), а также для группы больных РШМ по сравнению с группой больных дисплазией эпителия шейки матки ($p = 0,02$, OR(95CI%) = 1.11 (1.01 – 1.22)). Для смешанной и интегрированной формы ВПЧ статистически значимых различий выявлено не было (рис. 1). Сравнение распределения частот всех трех форм

(эписомальной, смешанной и интегрированной) между больными РШМ и CIN I-III в таблице 2×3 (тест хи-квадрат) показало, что распределение частот форм вируса статистически значимо различается на уровне значимости 95 % ($p = 0,04$).

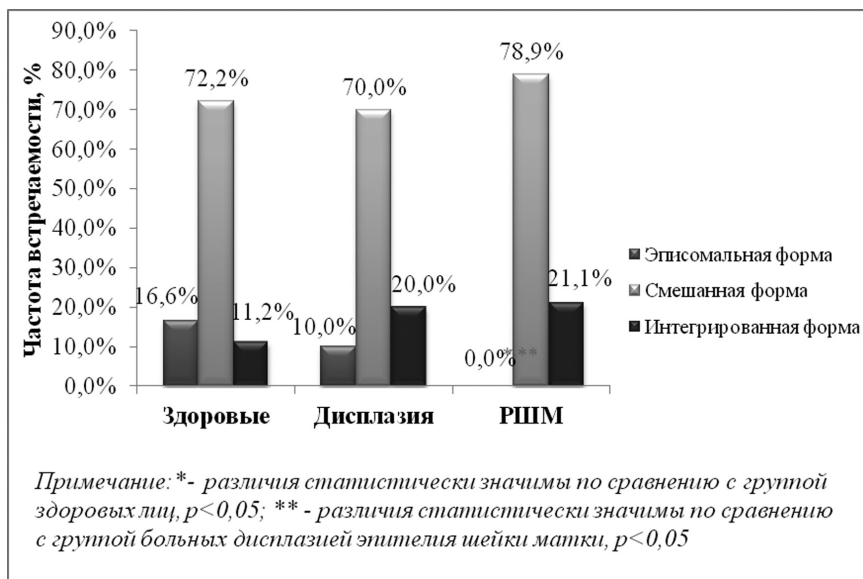


Рис. 1. Частота встречаемости различных форм ВПЧ 16 в группах наблюдения

Закключение. Полученные данные относительно физического статуса ВПЧ подтверждают значимость трансформирующего воздействия интегрированной формы ВПЧ на клетку-хозяина. Дальнейшее изучение патогенеза, особенностей клинического течения ВПЧ, а также раннее выявление физического статуса вируса в диагностическом плане позволит разработать более совершенную тактику комбинированной терапии с учетом различных клинических проявлений, что приведет к снижению количества рецидивов и прогрессии злокачественной трансформации при патологиях шейки матки.

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ РИККЕТСИЙ И ИХ ПЕРЕНОСЧИКОВ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

М. Ю. Карташов^{1,2}, Т. П. Микрюкова^{1,3}, В. А. Терновой^{1,3},
Н. С. Москвитина³, В. Б. Локтев^{1,2,3}

¹ ФБУН «Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор», ² Национальный исследовательский
Новосибирский государственный университет, ³ Национальный
исследовательский Томский государственный университет

Введение. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, составляют подавляющую часть всех регистрируемых случаев природноочаговых инфекций в России. Наряду с вирусным клещевым энцефалитом и иксодовым клещевым боррелиозом, риккетсиозы занимают важное место в структуре инфекционной патологии. В настоящее время в России регистрируют заболевания только двумя риккетсиозами из группы клещевой пятнистой лихорадки: североазиатский клещевой риккетсиоз, вызываемый *R. sibirica* и распространенный преимущественно в азиатской части России, и астраханская пятнистая лихорадка, встречающаяся на побережье Каспийского моря и вызываемая *R. conori subsp. caspia*. Кроме того, случаи риккетсиоза, вызванного *R. heilongjiangensis*, зарегистрированы в Хабаровском крае. Использование современных молекулярно-биологических методов позволило обнаружить в клещах, собранных на территории России, генетический материал и других патогенных для человека видов риккетсий, а так же риккетсий с неустановленной патогенностью (*R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. helvetica*, *R. aeschlimannii*, *Candidatus R. tarasevichiae* и др.).

Цель данного исследования состояла в изучении распространения и видового разнообразия риккетсий в клещах рода *Ixodes* и *Dermacentor*, собранных в различных биотопах Новосибирской области или снятых с людей, обратившихся в пункт серопрофилактики.

Задачи, поставленные для решения цели исследования, включали в себя сбор клещей; установление их видовой принадлежности путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы; детекция генетического материала риккетсий в собранных клещах методом ПЦР; генотипирование выявленных риккетсий путем определения нуклеотидных последовательностей фрагментов ряда маркерных генов, а также анализ полученных результатов.

Материалы и методы. В исследование взято 805 клещей: 305 клещей было собрано в окрестностях г. Новосибирска в весенне-летний период 2014 г. **методом сбора «на флаг»**, 500 клещей было снято с людей, обратившихся за медицинской помощью в пункт серопрофилактики в мае 2014 года. **Гомогенизацию** образцов осуществляли с использованием лабораторного гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот производили из 100 мкл гомогената методом фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора «Литех» (Россия) согласно инструкции производителя. Для генотипирования вида клещей были использованы праймеры на фрагмент гена субъединицы I цитохромоксидазы *COI*, локализованного в митохондриальном геноме клещей [1]. С целью скрининга исследуемых образцов на наличие ДНК риккетсий была использована пара праймеров CS409d и RP1258n [2], предназначенных для выявления фрагмента гена *gltA* длиной 769 н. **ДНК-фрагменты были секвенированы на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).** Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с ранее опубликованными при помощи поискового приложения BLAST с использованием сервера NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты. В исследование вошла выборка из 305 клещей (220 клещей рода *Ixodes* и 85 клещей рода *Dermacentor*), собранных «на флаг» в окрестностях г. Новосибирск. Среди клещей рода *Ixodes* встречались представители двух видов — *I. persulcatus* (42 клеща) и *I. pavlovskyi* (178 клещей). Клещи рода *Dermacentor* были представ-

лены одним видом *Dermacentor reticulatus*. По результатам исследования методом ПЦР уровень зараженности риккетсиями клещей рода *Ixodes* составил $13,1 \pm 2,2\%$, для клещей *D. reticulatus* он составил $38,2 \pm 5,4\%$.

Из 500 снятых с людей клещей 309 были отнесены к роду *Ixodes* (226 — *I. persulcatus* и 83 — *I. pavlovskyi*); 191 образец к роду *Dermacentor* (164 — *D. reticulatus* и 27 — *D. marginatus*). Уровень инфицированности клещей рода *Ixodes* составил $24,5 \pm 2,4\%$. Для клещей рода *Dermacentor* показатель оказался равным $40,3 \pm 3,5\%$.

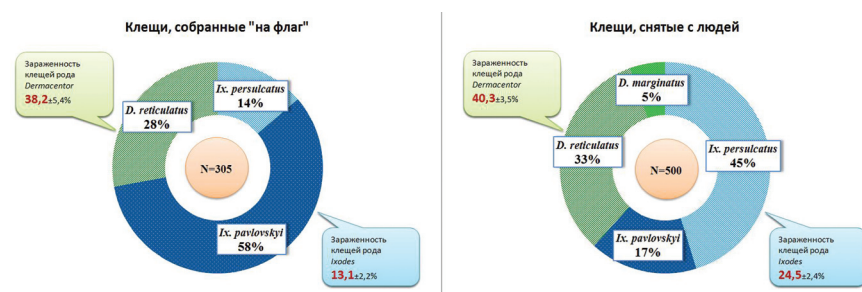


Рис 1. Видовой состав исследуемых клещей и уровень зараженности клещей риккетсиями

Результаты генотипирования риккетсий по гену *gltA* показали, что клещи рода *Ixodes* в подавляющем числе случаев инфицированы *Candidatus R. tarasevichiae*, однако из двух клещей *I. persulcatus*, снятых с людей, была изолирована ДНК *R. helvetica*. Генотипирование риккетсий, изолированных от клещей рода *Dermacentor* показало их принадлежность к *R. raoultii*. В одном случае из клеща *D. marginatus*, снятого с человека, была изолирована ДНК *R. sibirica*.

Уровень гомологии по фрагменту гена *gltA* всех выделенных изолятов *Candidatus R. tarasevichiae* из Новосибирской области составил 100% с изолятами, ранее обнаруженными в Западной Сибири (*Candidatus R. tarasevichiae* strain Ust'-Tarka, DQ168981) и Восточной Сибири (*Candidatus R. tarasevichiae* strain Stolby, DQ168982), а также в Китае (*Candidatus R. tarasevichiae* isolate MDJ13, JX996054).

Гомология нуклеотидной последовательности гена *gltA* выделенной *R. helvetica* составила 100% с последовательностью изолятов *R. helvetica*, циркулирующих в Германии (HQ232251) и Румынии (JX683116). Изоляты *R. raoultii* из Новосибирской области по фрагменту гена *gltA* идентичны ранее описанным изолятам, циркулирующим в Европе (DQ365803, AF120029). Кластеризация на филогендрограмме изучаемых изолятов со своими прототипами при достоверном индексе поддержки ветвей (≥ 70) свидетельствует о корректности проведенного нами генотипирования.

Заболевания, вызываемые выявленными в клещах возбудителями, отличаются разнообразием клинических симптомов, поэтому они могут быть ошибочно приняты за более распространенный Североазиатский клещевой риккетсиоз разной степени тяжести [3].

До недавнего времени *Candidatus R. tarasevichiae* находилась в статусе риккетсии с неустановленной патогенностью. В 2013 году китайскими врачами была описана клиническая симптоматика у 5 пациентов, в крови которых была детектирована ДНК этой бактерии [4]. Присутствие *Candidatus R. tarasevichiae* выявлено в иксодовых клещах, собранных в различных регионах России от Архангельской области до Камчатки и Приморского края, однако инфекции, вызываемые этим патогеном, в России пока не диагностированы.

Клинические проявления инфекции, вызываемой *R. helvetica*, довольно разнообразны. Инфекция может иметь мягкое течение с развитием лихорадки, сыпи и миалгии. Инфекция может протекать и более серьезно. Так ДНК *R. helvetica* была изолирована от пациентов с менингитом, а также обнаружена в образцах от нескольких больных, умерших от перимиеокардита. *R. helvetica* циркулирует в клещах *I. ricinus* и *I. persulcatus* на обширной территории от Франции до Японии и Таиланда. В России *R. helvetica* детектирована в Пермском крае, Челябинской области и на Камчатке.

В настоящее время роль *R. raoultii* в качестве этиологического агента синдрома TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy; лимфаденопатия, передающаяся клещами) подтверждена серологическими методами и выявлением ДНК в крови больных. *R. raoultii* широко

распространена в Европе (Франция, Испания, Германия, Венгрия, Польша), встречается также в Азии и Северной Африке. Ранее ДНК риккетсий, генетически близких к *R. raoultii*, была обнаружена на территории Омской области и Алтайского края, а также на территории Казахстана.

Полученные данные подтверждают широкое распространение и разнообразный видовой состав риккетсий, переносимых клещами на территории Новосибирской области, и поднимают вопрос о необходимости коррекции существующих методов дифференциальной диагностики вызываемых ими инфекций. Совершенствование лабораторной диагностики, основанной прежде всего на молекулярных методах, позволит осуществлять более быструю и надежную идентификацию классических и новых риккетсиозов, а также клинических случаев с атипичными симптомами.

Список литературы

1. Mikryukova T. P. и др. Complete mitogenome of the ixodid tick *Ixodes pavlovskyi* (Acari: Ixodida) // Mitochondrial DNA. 2014.
2. Roux V. и др. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae // Int. J. Syst. Bacteriol. 1997. Т. 47, № 2. С. 252–261.
3. Еремеева М. Е., Шпынов С. Н., Токаревич Н. К. Современные подходы к лабораторной диагностике риккетсиозов // Инфекция и иммунитет. 2014. Т. 4, № 2. С. 113–134.
4. Jia N. и др. Human infection with *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* // N. Engl. J. Med. United States, 2013. Т. 369, № 12. С. 1178–1180.

ФОРМИРОВАНИЕ НЕОБРАТИМЫХ КОМПЛЕКСОВ С ДНК — ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ ФУНКЦИЯ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ *

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

*Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) (КФ 1.2.1.12) широко известна как фермент гликолиза, катализирующий реакцию: D-глицеральдегид-3-фосфат + NAD⁺ + HPO₄²⁻ ↔ 1,3-дифосфоглицерат + NADH + H⁺. Активный фермент является тетрамером с молекулярной массой около 150 кДа, состоящим из одинаковых субъединиц с массой около 37 кДа. Мономер GAPDH имеет NAD⁺-связывающий центр, находящийся в пределах амнокислотных остатков 1–150. GAPDH — эволюционно консервативный белок; ее доля может составлять до 10–20 % от общего количества белка в клетке. Кроме того, GAPDH имеет множество дополнительных функций, не связанных с гликолизом, участвуя в мембранном транспорте, сборке микротрубочек, клеточной сигнализации и др. GAPDH способна взаимодействовать с ДНК и РНК, повреждениями ДНК (структурными аналогами нуклеотидов и ковалентными аддуктами ДНК с алкилирующими агентами) и ферментами репарации ДНК (APE1, HMGBl).

Апуриновые/апиримидиновые (AP) сайты, возникающие в клетках млекопитающих с частотой от 10000 до 50000 раз в сутки, — одни из наиболее распространенных повреждений геномной ДНК. Потеря оснований ДНК и последующее формирование AP-сайтов происходят путем спонтанного гидролиза N-гликозидной связи или в результате катализируемого ДНК-гликозилазами удаления по-

* Работа поддержана РНФ (проекты № 14-24-00038, 14-14-00501), программой президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ (проект № 13-04-01426).

врежденных оснований на ранней стадии процесса эксцизионной репарации оснований. Нерепарированные AP-сайты мутагенны и цитотоксичны.

Целью данного исследования являлась идентификация белка клеточных экстрактов человека, специфично взаимодействующего с AP-сайтом в составе одноцепочечной ДНК и частичного ДНК-дуплекса, содержащего длинные одноцепочечные концы. В работе использовали сшивку белков с AP-ДНК в присутствии боргидрида натрия, опосредованную образованием основания Шиффа, в комбинации с гелем электрофорезом и MALDI-TOF масс-спектрометрией.

Белок, который в присутствии боргидрида формирует преобладающий ковалентный аддукт с молекулярной массой около 45 кДа с AP-ДНК, содержащей одноцепочечные участки, был идентифицирован как изоформа GAPDH методом пептидного картирования на основе данных масс-спектрометрии. Затем GAPDH была выделена из клеток HeLa для изучения ее взаимодействия с различными типами AP-ДНК. Показано, что GAPDH формирует не только боргидрид-зависимые, но и боргидрид-независимые аддукты с AP-сайтами. Доля последних составляет около 30 %, они являются необратимыми (в отличие от оснований Шиффа) и формируются, вероятно, при участии окисленных SH-групп белка. Данное предположение подтверждается тем, что после восстановления дисульфидной связи GAPDH теряет способность образовывать аддукты с AP-ДНК. NAD^+ также ингибирует образование аддуктов GAPDH–AP-ДНК, поскольку во взаимодействии GAPDH с ДНК участвует ее NAD^+ -связывающий центр. Установлено, что GAPDH взаимодействует преимущественно с AP-сайтами, расщепленными по механизму β -элиминирования (спонтанно или под действием AP-лиаз), однако не обладает AP-лиазной активностью. Кроме того, была исследована возможность использования AP-ДНК в качестве зонда для детекции GAPDH в клеточных экстрактах. Показано, что GAPDH формирует аддукты с AP-ДНК с наибольшей интенсивностью в экстрактах клеток лимфоидного происхождения.

На основе вышеописанного в клетках может осуществляться следующий сценарий. В условиях окислительного стресса в GAPDH об-

разуется дисульфидная связь, что, согласно литературным данным, повышает ее способность связываться с ДНК. Затем GAPDH перемещается в ядро, где она может присутствовать в форме мономера или димера. В то же время при окислительном стрессе повреждается ДНК и активируется PARP-1, синтезирующая поли(ADP-рибозу) с использованием NAD⁺. В результате этого истощается клеточный пул NAD⁺, освобождается NAD⁺-связывающий центр GAPDH, и фермент приобретает способность связываться с ДНК. Если в одноцепочечном фрагменте ДНК присутствует расщепленный AP-сайт, GAPDH формирует стабильный ковалентный аддукт с этим повреждением. Таким образом, формирование необратимого комплекса GAPDH с ДНК является «суицидальным» событием, которое препятствует репарации ДНК в случае, если накоплено слишком много повреждений, и может быть одним из факторов, приводящих к апоптозу.

Список литературы

Kosova A. A., Khodyreva S. N., Lavrik O. I. (2015) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) interacts with apurinic/apyrimidinic sites in DNA. *Mutat. Res.*, 779, p. 46–57.

ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ДНК- ПРОЦЕССИРУЮЩИМИ ФЕРМЕНТАМИ *

О. С. Кравчук, М. С. Купрюшкин, Е. В. Дмитриенко

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

Достижения в области молекулярной биологии в конце XX века привели к широкому использованию олигонуклеотидов и их про-

* Научный руководитель — канд. хим. наук Е. В. Дмитриенко.

изводных в качестве эффективного инструмента для исследований. В настоящее время, аналоги олигонуклеотидов, содержащие в своем составе различные модификации, продолжают завоевывать все больший интерес исследователей. Модификации позволяют вводить в состав олигонуклеотида различные реакционноспособные, интеркалирующие, репортерные группы, с помощью которых удастся направленно изменять свойства олигонуклеотидов или придавать им необходимые функции.

Существует несколько типов модификации структуры олигонуклеотидов в зависимости от места их введения: модификация по гетероциклическому основанию, модификация по дезоксирибозе, модификация по межнуклеотидной связи.

Зачастую, при использовании аналогов нуклеиновых кислот, возникают проблемы, связанные с недостаточным и не специфичным проникновением олигонуклеотидов в клетки в отсутствие доставочных систем, а также, с невозможностью последних выжить в клеточных структурах или иных биологических средах. Одним из важных направлений модификации, позволяющее решить вышеуказанные проблемы- модификация природной фосфодиэфирной связи между соседними нуклеотидами. Таким образом, в конце 2014 г. в ИХБФМ СО РАН был предложен новый тип производных нуклеиновых кислот на основе фосфорилгуанидинов (ФГ) с регулируемым числом заряженных остатков. [1] В отличие от нативных нуклеиновых кислот место фосфатных групп занимают незаряженные фосфорилгуанидиновые группировки. Так как новые фосфорилгуанидиновые аналоги не несут отрицательный заряд, то теоретически, они должны проще проникать сквозь клеточную мембрану. Что касается устойчивости к действию ферментов- данные аналоги нуклеиновых кислот прошли испытание на устойчивость к действию фосфодиэстеразы змеиного яда. Стоит обратить внимание на ещё одно важное свойство фосфорилгуанидинов. Установлено, что двойные спирали с фосфорилгуанидиновыми группами мало отличаются по стабильности от природной спирали ДНК.

Следовательно, фосфорилгуанидиновые производные нуклеиновых кислот расширяют возможности научных методов конструи-

рования синтетических нуклеиновых кислот как возможных лекарственных препаратов нового поколения и средств медицинской диагностики.

Цель работы — исследование субстратных свойств фосфорилгуанидиновых производных олигонуклеотидов в реакциях, катализируемых ДНК-процессирующими ферментами.

Сконструированы модельные системы для исследования субстратных свойств модифицированных олигонуклеотидов под действием ДНК-зависимых ферментов. В случае ферментативного удлинения с помощью Таq-полимеразы и фр.Кленова комплексы состояли из 20- звенной модифицированной матрицы и 8- звенного праймера или 30- звенной матрицы и 20- звенного модифицированного праймера. В случае лигирования исследована одна система, содержащая 20- звенную модифицированную матрицу и короткие лигируемые олигонуклеотиды длиной 8-и 12- звеньев. Таким образом, на примере 20- и 30-звенных олигонуклеотидных комплексов, содержащих ФГ-модификацию в разных положениях олигонуклеотида, выступающего как в качестве матрицы, так и удлиняемого фрагмента, изучена эффективность реакции элонгации с использованием ДНК-зависимых ДНК-полимераз и реакции лигирования с использованием ДНК-лигаз.

Показано, что число и положение модифицированных остатков является фактором, определяющим особенности топологии фермент-субстратного комплекса.

Список литературы

М. С. Купрюшкин, Д. В. Пышный, Д. А. Стеценко // *Acta naturae*, 2014, 6, 53.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНОГО МУТАНТА ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 (SCAN1) НА МОДЕЛЬНЫХ ДНК-СУБСТРАТАХ

Т. А. Кургина¹, Р. О. Анарбаев², О. И. Лаврик²

¹ *Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия),*

² *Институт химической биологии и фундаментальной медицины
(Новосибирск, Россия)*

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) — фермент, препятствующий накоплению ковалентных аддуктов топоизомеразы I (TOP1) с ДНК, гидролизует 3'-фосфотирозильные связи (Pouliot et. al. 2001). Каталитический механизм TOP1 включает в себя образование ковалентного интермедианта TOP1-ДНК. (Champroux, 2001). Зачастую, под действием каких-либо факторов комплекс TOP1-ДНК не разрушается, и фермент «застревает» на ДНК. TDP1 гидролизует остаток тирозина TOP1, ковалентно связанного с 3'-фосфатом ДНК, что также происходит с образованием ковалентного интермедианта (комплекс TDP1-ДНК) (Pommier et. al. 2006). Гомозиготная мутация в гене TDP1 (замена гистидина на аргинин в активном сайте TDP1) является причиной редкого нейродегенеративного заболевания — спиноцеребеллярной атаксии с аксональной нейропатией (SCAN1) (Takashima et.al. 2002). Исследования показали, что к появлению фенотипа SCAN1 приводит накопление ковалентных комплексов TDP1-ДНК, т.к. SCAN1 способен катализировать лишь стадию образования ковалентного интермедианта TDP1-ДНК, но не последующий гидролиз этого комплекса (Interthal et. al. 2005)

Целью нашей работы было выявление активности SCAN1 на модельных ДНК-субстратах.

В качестве тест-системы для определения активности TDP1 использовали олигонуклеотиды различной длины, имеющие флуорофор 5(6)-карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'-конце и тушитель Black Hole Quencher 1 (BHQ1) на 3'-конце. В данных структурах за счет

резонансного диполь-дипольного переноса энергии (FRET) от FAM к BHQ1 флуоресценция минимальна. Когда фермент отщепляет тушитель с 3'-конца, происходит распад структуры с последующим возгоранием флуоресценции. Для измерения флуоресценции использовался флуориметр CLARIOstar производства BMG LABTECH (Германия).

Нами была изучена активность SCAN1 на олигонуклеотидах с длиной цепи 6, 10 и 16 нуклеотидных остатков (н.о.) и шпилечной ДНК с 1,12-додекандиол-фосфатом, произведено варьирование концентрации субстрата. Сравнена активность SCAN1 и TDP1.

Реакционные смеси (объемом 20 мкл) содержали буфер (50 мМ TrisHCl, pH=8,0; 50 мМ NaCl; 1 мМ DTT;) и субстраты концентрацией 100–3 нМ. Реакция запускалась добавлением SCAN1 до конечной концентрации 20 нМ. Обсчёт данных проводился в программе MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH).

SCAN1, как и TDP1 способен катализировать отщепление BHQ1 с 3'-конца данных олигонуклеотидов и 1, 12-додекандиол-фосфат со шпилечной ДНК. С увеличением длины олигонуклеотидов увеличивается скорость реакции, а наибольшие показатели характерны для шпилечной ДНК. Активность SCAN1 на данных субстратах значительно ниже активности TDP1.

Таким образом мы изучили активность природного мутаната тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (SCAN1) на различных ДНК-субстратах. Шпилечная ДНК с додекандиол-фосфатом может использоваться в качестве тест-системы для определения активности SCAN1 in vitro. Данная тест-система позволяет выявлять активность SCAN1 наномолярной концентрации.

Список литературы

1. Pouliot J.J., Robertson C.A., Nash H.A. Pathways for repair of topoisomerase I covalent complexes in *Saccharomyces cerevisiae* // *Genes Cells*. — 2001. — № 6. — P. 677–687
2. Champoux JJ., DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism // *Annu. Rev. Biochem.* — 2001. — №70 — P. 369–413.

3. Pommier Y., Barcelo J., Rao R., Sordet O., Jobson A., Repair of Topoisomerase I-Mediated DNA Damage // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. — 2006. — №81. — P. 179–229.

4. Takashima H., Boerkoel C.F., John J., Saifi G.M., Salih M.A., Armstrong D., Mao Y., Quijcho F.A., Roa B.B., Nakagawa M., Stockton D.W., Lupski J.R., Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy // *Nat Genet*. — 2002. — №32 (2). — P. 267–72.

5. Interthal H., Chen H.J., Kehl-Fie T.E., Zotzmann J., Leppard J.B., Champoux J.J. SCAN1 mutant TDP1 accumulates the enzyme — DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity // *EMBO J*. — 2005. — №24 (12). — P. 2224–2233.

ЭФФЕКТЫ ИЗОФЛУРАНА И ДРУГИХ АНЕСТЕТИКОВ НА УРОВЕНЬ КЛЮЧЕВЫХ МЕТАБОЛИТОВ В ГИППОКАМПЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС *

П. Н. Меньшанов ^{1,2}, А. Е. Акулов ²

¹ *Новосибирский государственный университет,*

² *Институт цитологии и генетики СО РАН*

Ингаляционный галогенированный анестетик изофлюран и его аналоги способны существенно увеличивать уровень лактата в головном мозге взрослых животных [Boretius et al., 2013]. Нейроны очень чувствительны к изменениям pH [Ruusuvuori et al., 2010], поэтому индуцируемое изофлюраном увеличение уровня лактата и кислотности межклеточной среды может объяснить появление нейротоксических эффектов, наблюдаемых в мозге после длительного изофлюранового наркоза. Однако приводит ли подобное воздействие как ингаляционными, так и неингаляционными анестетиками к по-

* Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН №48, грантами МОН РФ МК-1207.2014.4, РФФИ № 15-34-20574 мол_а_вед, РФФИ 14-04-00219 А.

тенциально опасным метаболическим изменениям в незрелом мозге, остается неясным.

В работе исследовали эффекты ингаляционного анестетика изофлюрана и неингаляционных анестетиков пентобарбитала и уретана на уровень ключевых метаболитов в гиппокампе трехдневных крысят линии Вистар методом ^1H магнитно-резонансной спектроскопии на МРТ-томографе «Bruker BioSpec 117/16USR» (11.7 Тесла). Исследовали уровни аланина, аспартата, ГАМК, глутамата, креатина и фосфокреатина, лактата, таурина, N-ацетиласпартата. Для выявления базального уровня ключевых метаболитов в полном соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [приказ Минздрава СССР № 755 от 12 августа 1977 г.] и Директивой Европарламента 2010/63/EU также был разработан метод неинвазивной прижизненной фиксации, позволяющий регистрировать спектр ключевых метаболитов без применения общих анестетиков.

Показано, что однократное введение уретана дозозависимо увеличивало уровень лактата в гиппокампе трехдневных крысят на протяжении всего времени действия анестетика. Аналогичное увеличение уровня лактата было выявлено и после введения пентобарбитала. Однако в отличие от взрослых животных, полуторачасовая изофлюрановая анестезия не влияла на уровень этого ключевого метаболита в гиппокампе неонатальных крысят.

Полученные данные подтверждают возможность применения не-продолжительного изофлюранового, но не уретанового и пентобарбиталового наркоза для прижизненного определения уровня ключевых метаболитов в головном мозге неонатальных крыс методом ^1H магнитно-резонансной спектроскопии. Результаты работы также свидетельствуют о существенных отличиях действия как ингаляционных, так и неингаляционных анестетиков в формирующемся и взрослом головном мозге.

МИКРОРНК СЛЮНЫ В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИЙ ГОРТАНИ

Е. Г. Никитина, О. В. Черемисина, Н. В. Литвяков

ФГБНУ «Томский НИИ онкологии»

Актуальность: обнаружение внеклеточных РНК в слюне открыло для ученых новое поле возможностей и зародило интерес к исследованиям природы, происхождения и биологических качеств РНК слюны [Park N.J.et al., 2006; Zhang L.et al., 2010], в том числе и микроРНК [Li Y.et al., 2004; Park N.J.et al., 2009]. Благодаря значительному количеству исследований посвященных слюне в настоящее время в литературе даже вошел в обиход термин «salivaomics» (Yan, Yu et al. 2008). Однако же в мировой литературе исследований посвященных проблеме канцерогенеза и предсказательной ценности использования микроРНК слюны при злокачественных опухолях крайне ограничено.

Цель работы: исследование паттерна микроРНК слюны пациентов с предопухолевыми и злокачественными патологиями гортани.

Материалы и методы: в работе использован супернатант слюны, полученной от пациентов с первичным гистологически верифицированным плоскоклеточным раком гортани (n=16) и лиц с предопухолевой патологией — дисплазией I-III степени (n=7). Уровень микроРНК-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205, -221 в слюне рассчитан по методу ΔCt (Livak and Schmittgen 2001), в качестве гена-рефери использована микроРНК-103. Статистическая обработка данных произведена с использованием t-теста Уэлша с применением критерия Бенджамини-Хохберга (FDR — false discovery rate) и дискриминантный анализ.

Результаты: проведен сравнительный анализ изменения уровня микроРНК в группе лиц с предопухолевой патологией и раком гортани (РГ). Дискриминантный анализ данных по уровню 7 микроРНК позволил выявить значимое различие в показателях между пациента-

ми с предраковыми изменениями и раком гортани ($F(21,29) = 5,55$, $p < 0,0033$, рис. 1), причем участие в стратификации образцов принимают все семь микроРНК. Показатели чувствительности и специфичности этого теста составили 71 % и 93 %, соответственно.

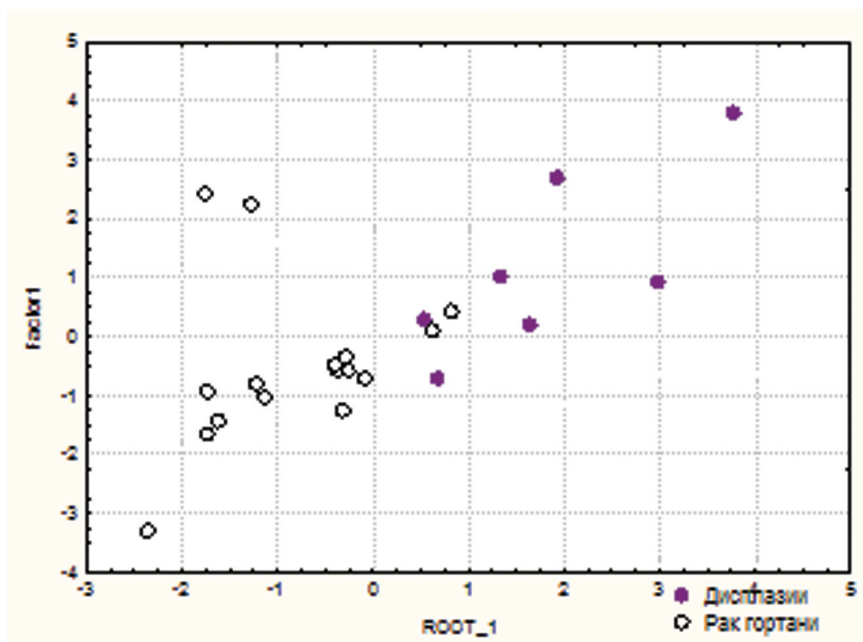


Рис. 1. Уровень 7 микроРНК в слюне в зависимости от диагноза. Примечание — А: по осям X и Y в виде ROOT-1 и Factor-1, представлены результаты дискриминантного анализа в виде условных значений по уровню микроРНК-18a, -21, -155, -200a, -200c, -205 и -221, в зависимости от диагноза

Показано статистически значимое различие в уровне некоторых отдельных микроРНК в слюне пациентов в зависимости от диагноза. Так, у пациентов с предопухоловой патологией в слюне обнаружен повышенный уровень микроРНК-21 и -200c в сравнение с группой пациентов с диагнозом рака гортани (7vs16, $p = 0,011$, $p = 0,0061$, со-

ответственно). Более того, при сравнении подгрупп лиц с дисплазией II-III степени и пациентов с 1–2 стадией рака также показана статистическая значимость разницы значений уровня микроРНК-18а, -21, -200с (4vs6, $p=0,002$, $p=0,007$, $p=0,013$, соответственно), что говорит в пользу возможности использования этого параметра в слюне для уточнения диагноза в дополнение к основным диагностическим методам.

Полученные результаты по определению уровня микроРНК в слюне пациентов с предопухоловой патологией и раком гортани свидетельствуют, что этот биоматериал подходит для данной процедуры и показывает стабильный, воспроизводимый результат. Данные дискриминантного анализа, показавшие наличие значимой разницы в уровне микроРНК-18а, -21 и -200с между подгруппами лиц с дисплазией II-III степени и больных РГ T1-2 свидетельствует о том, что слюна, биоматериал полученный неинвазивным путем, может быть использована для уточнения диагноза. Однако эти пилотные данные требуют уточнения на более крупной и унифицированной по клинико-патологическим параметрам выборке и выявления показателей чувствительности и специфичности подхода.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОГЕНА ПРОТИВ ВИЧ-1, ВКЛЮЧАЮЩЕГО ЭПИТОП ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА 10E8

А. П. Рудомётов¹, Д. Н. Щербаков^{1,2}, А. Ю. Бакулина^{1,3}

¹ ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», ² Алтайский государственный университет, ³ ГОУ «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Вирус иммунодефицита человека продолжает представлять серьезную угрозу в России и в мире. Традиционные методы создания вакцины показали свою несостоятельность в случае ВИЧ, и требуется развитие новых подходов к получению эффективной анти-ВИЧ

вакцины. Одним из перспективных подходов является создание искусственных иммуногенов, содержащих фрагменты вирусных белков. Примером такого иммуногена является ТВ1, входящий в состав вакцины КомбиВИЧвак, которая успешно прошла первую фазу клинических испытаний.

Мы решили использовать аналогичный подход и создать иммуноген, несущий эпитопы антитела 10Е8. Это широконейтрализующее моноклональное антитело было описано в 2012 году, оно связывается с вирусным гликопротеином gp41 в районе, близком к мембране, при этом не обладает аутореактивностью и не взаимодействует с фосфолипидами, в отличие от других антител связывающихся с МРЕР регионом.

С помощью классификатора белковых структур SCOP была выбран небольшой глобулярный белок, в N-конец и С-конец которого были встроены эпитопы 10Е8. Им оказался неохарактеризованный белок *B. subtilis* YkuJ. Моделирование структуры полученного искусственного белка YkuJ-10Е8е показало, что с ним могут связываться одновременно два антитела 10Е8.

Был синтезирован ген белка YkuJ-10Е8е с полигистидиновым тегом для очистки металл-хелатной аффинной хроматографией. В ген были введены сайты рестрикции, чтобы каждый из эпитопов было нетрудно заменить. Ген был клонирован в состав плазмиды pET21a, которой была трансформирована культура BL21. После трансформации наращивали культуру до ОП 0.8 и проводили индукцию IPTG. Экспрессию белка YkuJ-10Е8е оценивали электрофорезом в ПААГ. Электрофорез показал интенсивную полосу, по подвижности соответствующую рассчитанному белку.

Для подтверждения того, что белок YkuJ-10Е8е связывается с антителами 10Е8, был проведен дот-блот анализ. Он подтвердил, что эпитопы 10Е8 в составе искусственного белка распознаются антителами.

Белок YkuJ-10Е8е был наработан и очищен для иммунизации мышей. После первой иммунизации все мыши остались живы, это говорит о том, что белок не токсичен.

Способность полученного иммуногена индуцировать в организме образование широконейтрализующих антител будет оценена в реак-

ции вируснейтрализации с использованием коллекции псевдовирусов ВИЧ-1 существующих стандартизованных панелей и штаммов, циркулирующих в Сибирском Федеральном округе, сыворотками иммунизированных мышей.

В дальнейших исследованиях планируется заменить эпитопы 10E8 на эпитопы других антител, связывающихся в том же районе gp41, либо на их аналоги, полученные методом фагового дисплея. Ожидается, что аналоги эпитопов могут лучше сохранять свою структуру в отсутствие мембраны, и поэтому лучше вызывать протективный иммунный ответ против ВИЧ-1.

ENV-ПСЕВДОВИРУСЫ ВИЧ-1, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Н. С. Щербакова, А. П. Рудометов, С. Ф. Орешкова, Л. И. Карпенко

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

На сегодняшний день число ВИЧ-инфицированных людей в мире насчитывает 35 млн. человек. В России, к началу 2015 г. выявлено более 900 тыс. ВИЧ-инфицированных (<http://www.hivrussia.ru/>). В Новосибирской области проблема стоит особенно остро. На 1 января 2015 года более 1 % трудоспособного населения области являются ВИЧ-положительными. В этих условиях разработка новых антиретровирусных препаратов и создание профилактической вакцины против ВИЧ-1 является необходимым. Перспективным направлением в разработке вакцин против ВИЧ инфекции является создание иммуногена, который способен стимулировать в организме образование антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении большинства первичных изолятов ВИЧ-1. При этом оценка нейтрализующих свойств сывороток, полученных после иммунизации такими иммуногенами становится одной из центральных задач.

Использование технологии env-псевдовитипрованных вирусов ВИЧ-1 является сегодня одним из самых популярных методов анализа нейтрализующей активности вакцин против ВИЧ-1 в странах Европы и США. Env-псевдовirusы ВИЧ-1 представляют собой получаемые *in vitro* вирусные препараты, которые имитируют первичные изоляты ВИЧ-1. Данная система обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью, позволяет значительно сократить время анализа по сравнению с другими подходами. Преимуществом системы является также возможность использования вирусных частиц из большого числа субтипов ВИЧ-1.

Цель работы — создание env-псевдовirusов ВИЧ-1 штаммов, циркулирующих на территории НСО.

Для работы были взяты 20 сывороток ВИЧ-инфицированных пациентов из Новосибирского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. Для амплификации гена Env была проведена полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вирусной РНК и последующая гнездовая ПЦР. Были определены нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов, и проведен их анализ при помощи специализированных программ. На основе полученной информации было построено филогенетическое дерево и было показано, что ВИЧ-1 в исследуемых образцах сывороток принадлежат к рекомбинантной форме CRF63_02A1.

Далее амплифицированный полноразмерный ген Env был клонирован в составе вектора pcDNA 3.1/V5-His TOPO. Для получения псевдовirusов была проведена магнитная ко-трансфекция эукариотических клеток 293Т двумя видами плазмид: одна, полученная нами, содержит ген Env, а другая — backbone-плазида — содержит все остальные гены ВИЧ-1, за исключением гена Env. В результате ко-трансфекции, клетки 293-Т начинают продуцировать псевдовirusы ВИЧ-1, способные к однократному инфицированию чувствительных клеток, но не способные к дальнейшей репликации. Функциональную активность и TCID₅₀ псевдовirusов определяли на чувствительных клетках TZM-bl по величине сигнала люминисценции вследствие экспрессии Tat- индуцируемого гена люциферазы в клетках.

Таким образом, нами были получены функционально активные псевдовirusы рекомбинантной формы CRF63_02A1, распространенной в Новосибирской области.

РАЗРАБОТКА БИОЧИПА НА ОСНОВЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ

Н. С. Кожабергенов, В. М. Строчков, Е. Д. Бурашев,
К. А. Шораева, К. Т. Султанкулова

*РГП «Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности» КН МОН РК
(Республика Казахстан, пгт. Гвардейский)*

В последние годы всё большее применение при постановке диагноза находят биочипы (микрочипы, микроматрицы) — небольшие аналитические устройства, имеющие в себе компоненты биологического происхождения и предназначенные для проведения одновременного параллельного анализа многих межмолекулярных взаимодействий. Биочип представляет собой твердый субстрат, на поверхность которого нанесен упорядоченный рисунок (чаще всего решетка) микропятен одного или нескольких биологических веществ. На подложке биочипа могут быть иммобилизованы молекулы различных веществ биологического происхождения. Чаще всего это молекулы белков или нуклеиновых кислот.

Биочипы используются для самых разных целей. В медицине биочипы помогают за считанные часы обнаруживать у больных лекарственно устойчивые формы туберкулеза. Еще одно очень важное медицинское применение биочипов — это диагностика лейкозов и других раковых заболеваний.

Основной целью научно-исследовательской работы является разработка современного средства идентификации возбудителей птичьих вирусных инфекций для повышения эффективности борьбы с биологическими опасностями.

В результате исследований сформированы требования для разработки ДНК-биочипов, и определён спектр выявляемых возбудителей птичьих инфекций, для детекции которых предназначена данная тест-система. В ходе исследований был выполнен сбор, компьютерный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей генов вируса гриппа, болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита и инфекционного бурсита кур. Определены консервативные области для каждого отдельного гена вышеуказанных вирусных инфекций. Проведен отбор и синтез олигонуклеотидных зондов и показана их высокая специфичность. Подобранные зонды были проанализированы с помощью программы BLAST на предмет их возможной гомологии со всеми известными последовательностями, имеющимися в базе данных GenBank на текущий момент времени.

При разработке диагностического биочипа были использованы олигонуклеотидные зонды длиной 40 — 60 нуклеотидов. Для иммобилизации олигонуклеотидов использовали микробиологические стекла с альдегидным покрытием. Зонды наносили на подложку методом контактной печати на принтере **Nano Print LM 60, Arrayit Corporation**, США. Исследуемые образцы амплифицировали с помощью подобранных рандом праймеров и метили цианиновым красителем **Sy-5 (dCTP) на стадии ОТ-ПЦР**. Для детекции комплементарно связавшихся меченых проб со специфическими зондами в процессе гибридизации, использовали флуоресцентный сканер **InnoScan 710 AL** с программным обеспечением **MAPIX 5.5**.

Данная работа выполняется в рамках республиканского проекта на тему: «Разработка и испытание микрочипа для экспресс-диагностики вирусных болезней птиц» на 2015–2017 гг., шифр программы Г.2015, номер гос. регистрации №0115PK01976.

По завершению проекта будут разработаны лабораторно-технологические регламенты изготовления и использования биочипов для конструирования на их основе отечественных высокоэффективных тест-систем, предназначенных для раннего выявления и дифференциальной диагностики вирусных возбудителей болезней птиц.

Прикладная значимость проекта заключается в появлении возможности проведения ранней диагностики и идентификации ви-

русных болезней птиц методом, основанным на технологии ДНК-микрочипов.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ РАННЕГО ОТВЕТА C-FOS И C-JUN В ОТДЕЛАХ НЕОНАТАЛЬНОГО МОЗГА КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ ДЕКСАМЕТАЗОНА *

Е. В. Сухарева, Д. А. Ланшаков

Институт цитологии и генетики СО РАН

Белки раннего ответа семейств Jun и Fos регулируют экспрессию генов, образуя AP-1 транскрипционный комплекс — в виде гомодимеров Jun/Jun или гетеродимеров Jun/Fos белки взаимодействуют с консенсусной последовательностью TGACTCA, широко распространенной в промоторах генов. В состоянии покоя уровень экспрессии этих генов невысок, но значительно возрастает при активации клеток, в том числе и нервной системы. Именно поэтому уровень экспрессии гена *c-fos* считается показателем активности нейронов. Исследование в работе уровней мРНК генов *c-jun* и *c-fos* в развивающемся мозге крысят первой недели жизни выявило хорошо детектируемую методом ПЦР в реальном времени экспрессию генов, кодирующих белки семейств Jun и Fos, в отделах неонатального мозга, в отличие от взрослых животных, что свидетельствует о высокой интенсивности морфогенетических процессов в раннем онтогенезе. Известно, что в критический период перинатального развития мозг особенно чувствителен к действию внешних неблагоприятных факторов. Стресс, повышающий уровень глюкокортикоидов в крови, как и гормональная терапия дексаметазоном, приводит к долговременному и даже постоянному изменению активности нейромедиаторных систем мозга и регулируемых ими функций и поведения. Важным компонентом этих процессов может быть активация экспрессии генов раннего ответа. Изучение уровней мРНК

* Работа поддержана грантами 13-04-01104, 13-04-40014-Н, 14-04-31314.

генов *c-jun*, *c-fos* и соотношения их экспрессии в отделах неонатального мозга трехсуточных крысят после введения избирательного лиганда глюкокортикоидных рецепторов — дексаметазона (0.2 мг/кг) выявило специфические для передних (кора, гиппокамп) и задних (ствол) отделов мозга закономерности. Уровень мРНК гена раннего ответа *c-fos* повышался в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга на протяжении 30–60–120 минут после введения дексаметазона. В стволе головного мозга, имеющего более высокий уровень базальной экспрессии гена *c-fos*, чем в коре и гиппокампе, введение гормона приводило через 2 часа к снижению количества транскрипта. Обнаруженные на уровне мРНК изменения гена *c-fos* подтверждались оценкой экспрессии его белка методом иммуногистохимического окрашивания специфическими антителами в гиппокампе и области синего пятна ствола мозга. В результате, под действием дексаметазона соотношение уровней мРНК *c-jun* к *c-fos* в стволе мозга неонатальных крысят двукратно увеличивалось. Смещение соотношения экспрессии транскриптов *c-jun/c-fos* в сторону преобладания *c-jun* способно индуцировать экспрессию генов, содержащих AP-1 элемент в своем промоторе. Основанием для такого предположения является известная зависимость от компонентного состава белков, образующих AP-1 комплекс, для усиления или подавления экспрессии регулируемых транскриптов. Белки AP-1 комплекса активно взаимодействуют с другими транскрипционными факторами. Так, регуляция глюкокортикоидами экспрессии генов, помимо канонического механизма, обусловленного взаимодействием активированного гормоном глюкокортикоидного рецептора (GR), являющегося транскрипционным фактором, с гормон-зависимым элементом промотора генов (GRE), задействует и так называемый неканонический механизм, основанный на взаимодействии GR с белками AP-1. Этот механизм функционирует при регуляции глюкокортикоидами экспрессии генов, не содержащих GRE в своем промоторе, но изменяющих экспрессию под действием гормона. При этом образование AP-1 комплекса гомодимерами Jun/Jun повышает, а гетеродимерами Jun/Fos, напротив, понижает экспрессию зависимых генов. Впервые обнаруженное в работе смещение со-

отношения транскриптов *c-jun/c-fos*, приводящее к относительному увеличению *c-jun* под действием дексаметазона в стволе головного мозга неонатальных крысят, способно индуцировать экспрессию генов за счет белок-белкового взаимодействия глюкокортикоидного рецептора с Jun/Jun гомодимером AP-1 комплекса. Примером такого механизма является ген ключевого фермента синтеза катехоламинов — тирозингидроксилазы, который не имеет функционально активного GRE, но его экспрессия индуцируется глюкокортикоидами. Промотор гена ТГ содержит два AP-1 элемента и известно участие дистального AP-1 в глюкокортикоидной индукции фермента в культуре феохромацитомы. Установленное в работе смещение под действием дексаметазона соотношения белков Jun и Fos способно обеспечить обнаруженную индукцию гена и белка тирозингидроксилазы в стволе головного мозга неонатальных крысят к 6 часу после введения глюкокортикоидов.

АКТИВАЦИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЕКОМБИНАНТНЫМ АНАЛОГОМ ЛАКТАПТИНА *

О. С. Троицкая^{1,2}, А. В. Ткаченко¹, О. А. Коваль^{1,2}

¹ *ФГБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН,* ² *Федеральное
государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»*

В последние десятилетия одной из успешных противоопухолевых стратегий, отличных от хирургического вмешательства, рассматривают стратегию «двойного действия», когда с одной стороны, противоопухолевый препарат напрямую индуцирует апоптоз и гибель большинства раковых клеток, а с другой стороны, активизирует иммунную систему, клетки которой далее распознают, атакуют

* Научный руководитель — канд. биол. наук О. А. Коваль.

и уничтожают раковые клетки, слабобучствительные к химиотерапии. Ранее в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН из молока человека был выделен белок — лактаптин — протеолитический фрагмент каппа-казеина человека, вызывающий гибель раковых клеток в культуре.

Целью данной работы являлось изучение активации иммунной системы и вклада такой активации в противоопухолевое действие рекомбинантного аналога лактаптина RL2.

В экспериментах *in vivo* изучено цитокин-стимулирующее действие RL2. Методом Bio-Plex проанализировано изменение уровня 23-х цитокинов в сыворотке крови лабораторных мышей, получавших инъекции RL2. Показано, что после инъекций RL2 происходит достоверное увеличение уровня цитокинов: IL-10, IL-1 β , IL-2, G-CSF, KC, MCP-1, по сравнению с контрольными животными.

Исследована возможность индукции иммуногенного апоптоза аналогом лактаптина RL2. Экспозиция калретикулина на внешнюю клеточную мембрану (CRT), увеличение уровня внеклеточного АТФ и HMGB1 являются ключевыми событиями для реализации иммуногенного апоптоза. Методом проточной цитометрии показано, что при инкубации клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, MDA-MB-231 и рабдомиосаркомы мыши MX-7 с RL2 в течение 2–4 ч происходит увеличение CRT-положительной популяции клеток, что свидетельствует в пользу экспозиции CRT на внешней плазматической мембране, характерной для иммуногенного апоптоза. Также показано увеличение уровня внеклеточного АТФ после инкубации клеток MDA-MB-231 и MX-7 с RL2 в течение 20–24 ч, что является характерным признаком иммуногенной гибели клеток. Таким образом, RL2 является потенциальным индуктором гибели клеток по пути иммуногенного апоптоза.

ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ В РЕГУЛЯЦИИ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

М. М. Цыганов^{1,2}, М. К. Ибрагимова¹, П. В. Казанцева¹,
Е. М. Слонимская¹, Н. В. Чердынцева^{1,2}, Н. В. Литвяков^{1,2}

¹ Томский НИИ онкологии, Томск, Россия,

² Лаборатория трансляционной клеточной

и молекулярной биомедицины Национального исследовательского
Томского государственного университета, Томск, Россия

Наши предыдущие исследования показали, что эффективность неoadъювантной химиотерапии (НХТ) рака молочной железы (РМЖ) связана не с исходным уровнем экспрессии ABC-транспортеров (*ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*) в опухоли, а с изменением их экспрессии в процессе лечения. Если в процессе НХТ экспрессия генов ABC в опухоли снижается, то у больных отмечается клинический ответ на химиотерапию, если же при воздействии химиопрепаратов экспрессия генов ABC в опухоли повышается, то у таких больных формируется фенотип множественной лекарственной устойчивости и ответ на химиотерапию отсутствует (Litviakov, N. V., et al., 2013). Кроме этого нами были получены данные об одностороннем изменении экспрессии генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении неoadъювантной химиотерапии (Литвяков Н. В. и др., 2013). Несмотря на то, что все исследованные гены ABC располагаются в разных хромосомах, было высказано предположение о существовании функционального экспрессионного кластера ABC-транспортеров, за счет работы которого у большинства пациентов и происходит одностороннее изменение их экспрессии в опухоли под действием химиопрепаратов. Следует отметить, что формирование фенотипа МЛУ обусловлено комплексной работой нескольких ключевых генов ABC-транспортеров. Таким образом **целью настоящей работы** явилось доказательство

существования функционального экспрессионного кластера генов ABC у пациентов в опухоли молочной железы.

Материал и методы. В исследование было включено 68 больных РМЖ со стадией ПА — ППС, получавших в 2006–2010 годах лечение в клинике Томского НИИ онкологии. Больные в неоадьювантном режиме получали 2–4 курса ХТ по схемам FАC (фторурацил, доксорубицин, циклофосфан) или САХ (циклофосфан, доксорубицин, кселода). Затем проводилась операция и 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FАC, лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. РНК выделяли из 68 образцов после НХТ с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Оценку экспрессии генов МЛЮ: *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* проводили при помощи qRT-PCR. Относительная экспрессия была оценена с помощью метода Pfaffl, относительно гена-рефери *GAPDH* и нормальной ткани молочной железы. ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов и опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany).

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, которые содержат по 750 000 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) для каждого больного. Ассоциацию уровня экспрессии генов ABC после НХТ с SNP оценивали с использованием языка программирования «R» в программе «R version 3.0.2.». Для коррекции уровней значимости на множественные сравнения использовалась поправка Бонферрони.

Результаты. Прежде всего, при помощи корреляционного анализа, были определены группы коэкспрессии генов ABC-транспортеров до лечения и после НХТ. Считалось, что гены могут образовывать кластер, если все гены в него входящие коэкспрессируются друг с другом. Корреляционный анализ показал, что наибольшая группа, в которой ABC-транспортеры до лечения и после НХТ коэкспрессированы, имеет место быть для генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,27–0,81$, $p < 0,05$) (Таблица 1), что может говорить об общности механизмов регуляции экспрессии этих генов.

Таблица 1

Корреляция уровней экспрессии ABC-транспортеров
в опухоли молочной железы до лечения и после НХТ

	<i>ABCB1</i> до	<i>ABCC1</i> до	<i>ABCC2</i> до	<i>ABCG2</i> до	<i>ABCB3</i> до	<i>ABCC5</i> до	<i>ABCG1</i> до
<i>ABCB1</i> после	0,81*	0,30*	0,59*	0,61*	−0,00	0,34*	−0,11
<i>ABCC1</i> после	0,41*	0,63*	0,50*	0,42*	0,17	0,19	0,11
<i>ABCC2</i> после	0,47*	0,33*	0,72*	0,60*	−0,09	0,23	−0,15
<i>ABCG2</i> после	0,58*	0,27*	0,57*	0,74*	−0,18	0,31*	−0,14
<i>ABCB3</i> после	0,02	0,05	0,05	−0,02	0,47*	−0,29*	0,36*
<i>ABCC5</i> после	0,23	0,13	0,15	0,30*	−0,29*	0,61*	−0,22
<i>ABCG1</i> после	−0,01	0,11	0,07	−0,06	0,33*	−0,13	0,48*

Примечание: в таблице представлен коэффициент корреляции Спирмена; до — уровень экспрессии до лечения в биопсии; после — уровень экспрессии после НХТ в операционном материале; цветом и знаком * выделены статистически значимые корреляты.

Далее мы попытались связать экспрессию генов до лечения и после НХТ друг с другом через нормальную генетическую вариабельность, обусловленную генным полиморфизмом (SNP). С использованием лог-линейной регрессии (с учетом поправки Бонферрони на множественные сравнения) была проанализирована связь SNP с уровнем экспрессии генов ABC до лечения и после НХТ в рецессивной модели наследования. Если группа генов имела общие SNP, связанные с уровнем экспрессии всех генов и экспрессия генов ABC у носителей редкого генотипа была статистически значимо выше или ниже чем у носителей гетерозиготного и частого генотипов, это показывало связь этих генов и давало аргументы в пользу наличие у них функционального экспрессионного кластера. В результате статистической обработки данных, было показано, что максималь-

но возможную группу образуют те же четыре гена, что и по результатам корреляционного анализа: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2*. Для них было выявлено наибольшее количество перекрывающихся SNP. Установлено, что с начальным уровнем экспрессии полученных генов коррелирует 21 SNP: *DISP1* (rs17535305), *DISP1* (rs61840266), *SPAG16* (rs35945601), *NAF1* (rs17571991), *ECHDC1* (rs6569487), *TXLNB* (rs9495425), *ZNF890P* (rs62442010), *AMPH* (rs12701634), *LOXL2* (rs13272093), *C8orf37-AS1* (rs12549485), *KCNQ3* (rs7818112), *ST3GAL1/ZFAT* (rs13255060), *ZBED5* (rs10840501), *DAOA-AS1* (rs4771495), *DHRS4L1* (rs10147475), *CHD2* (rs28458425), *RGMA* (rs7165938), *STXBP4* (rs9303363), *ADCYAP1* (rs304400), *FHOD3* (rs12965274), *RALGAP2* (rs3827963).

Установлено, что у носителей мутантных генотипов всех вышеописанных полиморфизмов, кроме *SPAG16* (rs35945601), начальный уровень экспрессии был в 1,5–2 раза статистически значимо выше, по сравнению с носителями гетерозиготного или частого генотипов ($p < 0,001$). Эти данные могут подтверждать наличие функционального экспрессионного кластера исследуемых генов в опухоли молочной железы до воздействия химиопрепаратов.

После проведения НХТ количество общих полиморфизмов для группы генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* уменьшается до 6: *EPHA4* (rs2680835), *SCN10A* (rs4676478), *H2AFY* (rs6896596), *SLC25A21* (rs1154121), *RTN1* (rs1951366), *RTN1* (rs12018988), (рис. 1).

У всех носителей мутантного генотипа полиморфизмов *EPHA4* (rs2680835), *RTN1* (rs1951366) и *RTN1* (rs12018988), уровень экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости после проведения НХТ достоверно ниже, чем у носителей гетерозиготного и дикого генотипа ($p\text{-level} < 0,001$)

Закключение. Можно полагать, что нами приведены достаточно серьезные доводы, доказывающие существование в опухоли молочной железы функционального экспрессионного кластера генов АБС-транспортёров, состоящего из генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2*, который, по-видимому, имеет общий механизм регуляции экспрессии. Это подтверждается взаимной корреляцией уровня экспрессии

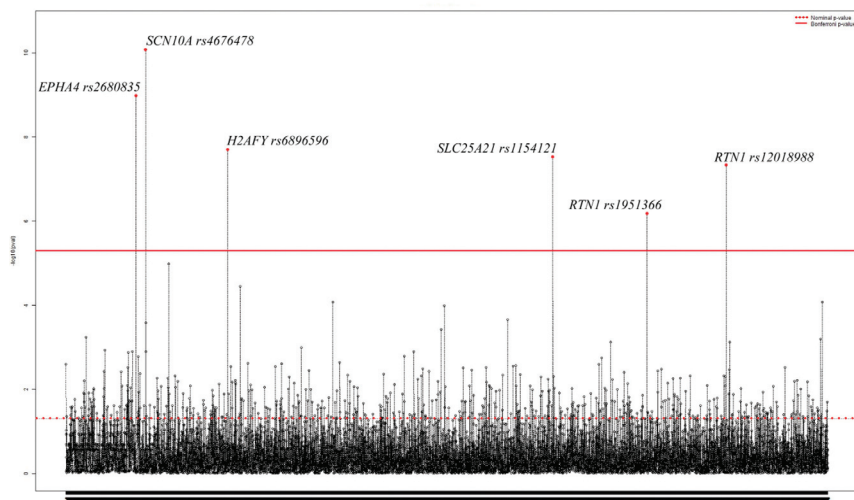


Рис. 1. Уровень статистической значимости связи SNP с экспрессией генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* после НХТ

Примечание: по оси ординат — значение десятичного логарифма уровня статистической значимости (p-level), по оси абсцисс — однонуклеотидные полиморфизмы ($n = 258586$ SNP). На рисунке красной пунктирной линией обозначено значение номинального p-level, красной сплошной линией значение p-level с учетом поправки Бонферрони

этих генов до лечения и после НХТ и наличием общих SNP, связанных с их экспрессией до лечения и после НХТ. Исследование непосредственно механизмов регуляции именно кластера генов АБС-транспортеров может способствовать выявлению новых мишеней для управления формированием фенотипа множественной лекарственной устойчивости опухоли в процессе химиотерапии.

ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ГЕТЕРОФАЗНОМ ВАРИАНТЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ НЕЗАРЯЖЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

А. В. Волкова^{1, 2}, А. А. Ломзов^{1, 2}, М. С. Купрюшкин¹,
Е. В. Дмитриенко^{1, 2}

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

Гибридизационный анализ нуклеиновых кислот — актуальное и перспективное направление в настоящее время, когда диагностика стремится к индивидуализации, компактизации и максимальной простоте в использовании. Совмещение указанных требований с тем или иным методом анализа возможно при конструировании биосенсорных систем, которые способны воспринимать и преобразовывать количественную или полуколичественную аналитическую информацию с использованием биологического распознающего элемента, находящегося в тесном контакте с преобразователем.

Лидирующим направлением развития области диагностических биосенсоров являются нанобиосенсоры на основе одномерной кремниевой нанопроволки в качестве затвора полевого транзистора, чувствительность и эффективность которого при выявлении нуклеиновых кислот зависит от заряда на поверхности нанопроволок.

Целью настоящей работы была разработка модельной системы гибридного анализа нуклеиновых кислот на поверхности, имитирующей нанопроволочный биосенсор, а именно: изучение эффективности иммобилизации незаряженных олигонуклеотидных зондов на поверхность, имитирующую нанопроволоку, и последующей гибридизации с нуклеотидными мишенями, в том числе после регенерации поверхности.

В качестве анализируемых мишеней использовались 20-звенные маркерные последовательности флуоресцентно-меченных РНК и ДНК, а в качестве зондов для иммобилизации — соответствующие олигомеры, несущие первичную аминогруппу, на основе незаряженных пептидил-нуклеиновых кислот (ПНК) и фосфорилгуанидиновых нуклеиновых кислот (НОНА).

Было проведено исследование эффективности иммобилизации зондов на поверхность, имитирующую кремниевую нанопроволоку, — модифицированные эпоксисиланом стеклянные слайды, а также эффективность гибридизации зондов с флуоресцентно-мечеными ДНК и/или РНК мишенями. В качестве контроля иммобилизации выступал аминокислотсодержащий флуоресцентный олигонуклеотидный зонд. Показано, что предложенная модельная система позволяет успешно выявлять целевые матрицы-мишени как в буферных, так и в водных условиях, однако, в последнем случае наблюдается высокая неспецифическая сорбция. Уменьшение данного эффекта обеспечивали добавлением формамида в гибридизационную смесь, объемное содержание которого зависит от устойчивости образующегося гибридизационного комплекса. Продемонстрирована также возможность регенерации поверхности для проведения повторного гибридизационного анализа.

Стоит отметить, что в рамках данной работы впервые были исследованы гибридизационные свойства НОНА в формате гетерофазного гибридизационного анализа. Как видно из результатов работы, оптимизация условий необходима на каждом этапе процедуры, особенно тщательного проработки требуют непосредственно гибридизационные смеси, состав которых влияет на эффективность и специфичность получаемого результата. Проведенные пробные эксперименты по пробоподготовке анализируемого образца демонстрируют перспективность данного подхода, что говорит о необходимости проведения дальнейших экспериментов в этом направлении.

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЙ СБОРКУ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ, ЭКСПОНИРУЮЩИХ НА ПОВЕРХНОСТИ GP ВИРУСА ЭБОЛА

А. В. Зыбкина, Н. С. Щербакова, Д. Н. Щербаков

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

Геморрагическая лихорадка Эбола — острое вирусное заболевание. Впервые болезнь, вызываемая вирусом Эбола, заявила о себе в 1976 году. Последняя вспышка, начавшаяся в декабре 2013 года и не прекратившаяся по сей день, является самой крупномасштабной и сложной [3]. Вакцины и противовирусные препараты против вируса Эбола отсутствуют, что делает актуальным разработку специфических терапевтических препаратов [4]. Основным препятствием к включению большого числа научных коллективов в работу по разработке профилактических средств является высокий уровень летальности, ассоциированный с этим возбудителем. В последнее время для изучения различных аспектов особо опасных вирусных инфекций используют технологию псевдотипированных вирусов одного цикла инфекции. С использованием этой технологии удастся получать вирусные частицы, имитирующие молекулярные особенности поверхности натурального вируса, но не способные к репликации и поэтому безопасные для работы. Разработаны системы для псевдотипирования ВИЧ-1 [1], гриппа [2], клещевого энцефалита [5] и др. Использование этой технологии для получения псевдовирусов Эбола позволит значительно обезопасить и удешевить исследования этого патогена.

Цель работы — создание рекомбинантных плазмид, обеспечивающих сборку псевдовирусных частиц, экспонирующих на поверхности GP вируса Эбола.

Процедура получения псевдовируса заключалась в следующем. Для получения нуклеотидной последовательности, кодирующей

гликопротеин вируса Эбола, был проведен анализ геномов вируса, представленный в GenBank, была выбрана последовательность соответствующая изолятам вируса, полученным в ходе вспышки 2014–2015 годов. Синтез нуклеотидной последовательности был осуществлен коммерческой фирмой (ДНК-синтез, Москва). Соответствие нуклеотидной последовательности было подтверждено секвенированием. Полученная последовательность была клонирована в составе вектора pcDNA 3.1/V5-His TOPO. После трансформации компетентных клеток *E.coli* был проведен отбор плазмид, содержащих встроенный ген GP, методом ПЦР со следующими праймерами: **Ebola 1:** 5'-GTT-TCT-TTC-GGC-GAT-GAA-GAT-TAA-GCC-GAC-AGT-G-3', **Ebola back:** 5'-GTT-TCT-TTC-AAA-CCT-TGT-TTA-TGA-TTA-ACT-GTG-AG-3'. Для получения псевдовирuсов была проведена магнитная ко-трансфекция эукариотических клеток 293T двумя видами плазмид: одна, полученная нами, содержит ген GP вируса Эбола, а другая — backbone-плазида — содержит гены ВИЧ-1, за исключением гена Env (аналогом которого у вируса Эбола является ген GP). В результате ко-трансфекции клетки 293-T начинают продуцировать псевдовирuсные частицы, внутри которых располагается backbone-плазида, а снаружи находятся поверхностные гликопротеины вируса Эбола. Такие псевдовирuсы способны к однократному инфицированию чувствительных клеток, но не способные к дальнейшей репликации.

Функциональную активность псевдовирuсов определяли на чувствительных клетках TZM-bl — генетически модифицированной клеточной линии HeLa, которая презентует на своей поверхности большое число рецепторов с которыми способен связываться гликопротеин вируса Эбола и содержит репортерные гены люциферазы светлячка под контролем Tat-индуцируемого промотора. Уровень вирусной инфекции определялся по величине сигнала люминесценции вследствие экспрессии Tat- индуцируемого гена люциферазы в клетках TZM-bl.

Отобранный нами псевдовирuсoдeржaщий супернатант показал превышение сигнала люминисценции в 100 раз по сравнению с контролем, это говорит о том, что полученные псевдовирuсы эффективно инфицируют чувствительные клетки.

Таким образом, была получена рекомбинантная плаزمида, обеспечивающая сборку псевдовирусных частиц, экспонирующих на поверхности GP вируса Эбола.

Список литературы

1. Рудометов, А. П. Создание **env** псевдовирусов на основе штаммов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской области / А. П. Рудометов, Н. С. Щербакова // Научно-Исследовательский журнал. 2015. № 2 (33). С. 19–21.
2. D'Aoust, M. A. The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza / M. A. D'Aoust et al. // Plant biotechnology journal. 2010. Т. 8. №. 5. С. 607–619.
3. Labouba, I. Ebola outbreaks in 2014 / I. Labouba, E. M. Leroy // Journal of Clinical Virology. 2015. Т. 64. С. 109–110.
4. Wong, G. Backs against the Wall: Novel and Existing Strategies Used during the 2014–2015 Ebola Virus Outbreak / G. Wong, G. P. Kobinger // Clinical microbiology reviews. 2015. Т. 28. №. 3. С. 593–601.
5. Yoshii, K. Establishment of a neutralization test involving reporter gene-expressing virus-like particles of tick-borne encephalitis virus / K. Yoshii et al // Journal of virological methods. 2009. Т. 161. №. 1. С. 173–176.

АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОГО СХОДСТВА ГЕНОВ 16 ПОДСЕМЕЙСТВ ЦИТОХРОМОВ P450 6-ГО СЕМЕЙСТВА (CYP6) В РАЗНЫХ ОТРЯДАХ НАСЕКОМЫХ

С. А. Белая

Белорусский государственный университет

В настоящее время серьезную экологическую проблему представляет собой широкое использование пестицидов для борьбы с насекомыми-

фитофагами, переносчиками заболеваний человека и животных, вредителями запасов и т. д. Однако, как показывает практика, зачастую вредители демонстрируют способность быстро формировать устойчивость к ядам, в то время как полезные виды, например, пчелы и другие опылители, серьезно страдают от пестицидного пресса. В связи с этим изучение особенностей реализации «ответа» организма насекомых на инсектицидное давление является важной научной и прикладной задачей.

Как известно, ключевой ферментативной системой, обеспечивающей нейтрализацию токсинов у животных, является система цитохромов P450. Это группа ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков в клетках всех эукариот. У насекомых в детоксикации участвуют преимущественно цитохромы семейства 6 (CYP6), состоящего, как минимум, из 16 подсемейств. Несмотря на крайнюю важность системы детоксикации для жизни насекомых, точное количество генов CYP6, особенности их экспрессии, скорость эволюции этих систем у насекомых до сих пор не изучены в достаточной мере. Исследование генов, кодирующих цитохромы P450, представляет большую важность, прежде всего, поскольку знания такого рода могут быть чрезвычайно полезными в будущем для разработки инсектицидов избирательного действия. Изучение цитохромов P450 насекомых представляет собой непростую задачу из-за значительной вариабельности этих генов и большого числа их копий в геномах у представителей одного отряда (или даже вида). Целью нашей работы было оценить уровень подобия последовательностей генов цитохромов P450 6 семейства в разных таксонах насекомых с использованием методов биоинформатики с тем, чтобы соотнести направление эволюции семейства генов с эволюцией таксонов насекомых.

В работе были использованы 508 последовательностей генов CYP6 различных подсемейств 22-х видов насекомых, относящихся к отрядам: Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Hemiptera, Phthiraptera. Множественное выравнивание последовательностей провели в программе MEGA 6, используя алгоритм Muscle. Генное дерево построили с использованием алгоритма Minimum-Evolution Tree, статистическую достоверность топологии дерева провели методом бутстрэп-анализа для 500 реплик.

При построении генных деревьев мы полагали выяснить, как будет проходить кластеризация последовательностей: в соответствии с подсемейством белка, кодируемого конкретным геном цитохрома P450 6 семейства, или таксономической принадлежностью насекомого, для которого этот ген был расшифрован. Получение такого рода данных важно с точки зрения оценки общего уровня вариабельности генов и того, как они меняются в процессе видообразования у насекомых. Это позволит делать заключение о том, в какой степени сведения о генах цитохромов P450 6 семейства, полученных для насекомых одного вида, могут быть применены для генов, кодирующих белки того же подсемейства, в геноме насекомых других видов и отрядов.

Наши исследования показали, что кластеризация последовательностей генов цитохромов P450 6 семейства на генном дереве происходила значительно чаще в соответствии с отрядами насекомых, чем с их принадлежностью к подсемействам кодируемых белков. В частности, гены представителей отряда Diptera образовали на генном дереве несколько крупных кластеров. Например, последовательности представителей видов *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* отряда Diptera образовали на генном дереве отдельный кластер с индексом бутстрепа 100, несмотря на то, что белки, кодируемые этими генами, относятся к разным подсемействам («А» и «М») (рис. 1).

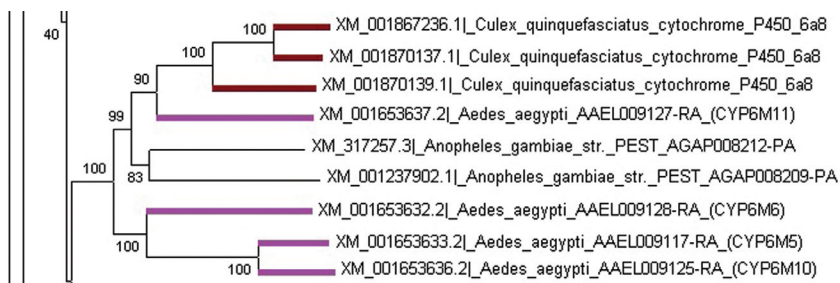


Рис. 1. Кластер, образованный последовательностями генов CYP6, кодирующих белки подсемейств «А» и «М»

Гены *C. uinefasciatus* и *A. aegypti*, кодирующие белки подсемейств «А» и «N», также на генном дереве образовали кластер с индексом бутстрепа 74.

Отдельный кластер на генном дереве был образован последовательностями вида *Plutella xylostella* отряда Lepidoptera. Индекс бутстрепа данного кластера составляет 18, что является очень низким показателем статистической значимости топологии ветвей. Белки, кодируемые этими генами, относились к подсемействам «А» и «В». В то же время последовательности видов *P. xylostella*, *Solenopsis invicta*, *Apis mellifera* и *Harpegnathos saltator* (отряд Hymenoptera) образовали на генном дереве еще один самостоятельный кластер, причем значение индекса бутстрепа было равным 85, что является высоким показателем. Белки, кодируемые генами, объединившимися в указанный кластер, относятся к подсемействам «К», «В», «G» (рис. 2).

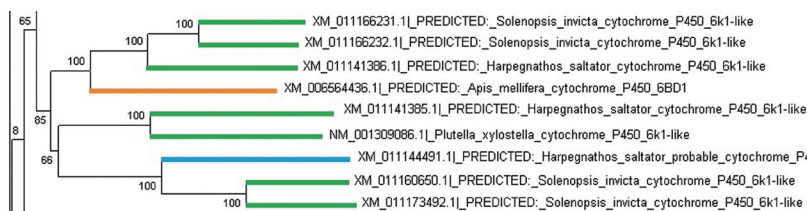


Рис. 2. Кластер, образованный последовательностями генов CYP6, кодирующих белки подсемейств «К», «В», «G»

Гены представителей вида *Acyrtosiphon pisum* отряда Hemiptera объединились в кластер с индексом бутстрепа 100, что является очень высоким показателем достоверности. Белки, кодируемые этими генами, также относились к разным подсемействам («А» и «К»).

Часть генов, кодирующих белки, относящиеся к подсемейству «А», образовали самостоятельный кластер на общем генном дереве, а именно, последовательности генов CYP6 представителей видов *S. invicta*, *A. mellifera* и *H. saltator* отряда Hymenoptera. Индекс бутстрепа для этого кластера был равен 85. Другая часть генов видов *S. invicta*, *A. mellifera* и *H. saltator* отряда Hymenoptera также обра-

зовали отдельный кластер на генном дереве с индексом бутстрепа 99. Белки, кодируемые этими генами, относились к подсемействам «А», «В» и «К». Однако два вышеописанных кластера, образованных последовательностями СУР6 видов отряда Hymenoptera, были объединены в еще больший кластер с индексом бутстрепа 8, что также является очень низким показателем статистической значимости топологии ветвей.

Следует отметить, что для многих расшифрованных последовательностей цитохромов P450 6 семейства подсемейства, к которым относятся белки, кодируемые этими генами, не были определены. Следовательно, кластеры, образованные данными последовательностями, учитывались нами в меньшей степени.

На основе полученных данных можно заключить, что в одном таксоне насекомых уровень нуклеотидного сходства между генами, кодирующими белки из разных подсемейств СУР6, выше, чем между генами, кодирующими белки одного подсемейства, в случае, когда они выделены из насекомых разных таксонов. Указанный факт свидетельствует о невозможности широкой экстраполяции данных, касающихся генов СУР6, между насекомыми разных отрядов.

СОДЕРЖАНИЕ

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Камбаралиева М. И., Федорова О. А., Магай Е. Б., Мавжудова А. М. АНТИФУНГАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МЕСТНЫХ ИЗОЛЯТОВ <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i> КАК ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫХ АГЕНТОВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ.....	3
Куцерубова Н. С., Богрянцева М. П., Сайфутдинова С. С., Нечаева Е. А. ВАЛИДАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКОПЛАЗМ	8
Оксантюк В. М., Колдар Л. А. МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ <i>COTINUS OBOVATUS</i> RAF. В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	10
Бабич П. И., Зарубин В. Н. ХРОНОТЕХНОЛОГИЯ ЛЕЧЕНИЯ ПУТЕМ КОРРЕКЦИИ БИОРИТМОВ БОЛЬНОЙ ТКАНИ.....	14
Тихонова А. О., Тойменцева А. А. НОВАЯ LIKE-СИСТЕМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОМЫШЛЕННО ВАЖНЫХ БЕЛКОВ	17
Алексеев И. В., Безбородова О. А., Немцова Е. Р., Геворков А. Р., Хмелевский Е. В., Соболев А. С., Якубовская Р. И., Свердлов Е. Д. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ГЕННО-ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ АНТИОНКОРАН-М ПОВЫШАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ	18
Башмакова Е. Е., Красицкая В. В., Франк Л. А. ВЫЯВЛЕНИЕ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ МЕТОДОМ	

ФЕРМЕНТАТИВНОГО УДЛИНЕНИЯ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНОГО ПРАЙМЕРА С ДВОЙНОЙ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ.....	20
---	----

Долгушин С. А., Середина Т. А., Одинцова Е. С., Базаев Н. А., Руденко П. В., Тронин А. В. РАЗРАБОТКА ПОРТАТИВНОГО МИКРОФЛЮИДНОГО КАРТРИДЖА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗНАЧЕНИЯ МЕЖДУНАРОДНОГО НОРМАЛИЗОВАННОГО ОТНОШЕНИЯ В ОБРАЗЦАХ ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ	25
--	----

Ершкова В. В. КОНСТРУИРОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ АССОЦИАТОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА МЕТОДОМ «СЛОЙ-ЗА-СЛОЕМ»	28
---	----

Илюхина Д. Л., Сулейманова А. Д. ШТАММ <i>PANTOEAE VAGANS</i> 3.2 — ПРОДУЦЕНТ СИДЕРОФОР КАТЕХОЛОВОГО РЯДА	31
--	----

Кузнецов В. В., Абдурашитов М. А., Томилов В. Н., Дегтярев С. Х. ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ — ТЕХНОЛОГИЯ КАРТИРОВАНИЯ САЙТОВ МЕТИЛИРОВАНИЯ <i>DE NOVO</i> В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА	34
--	----

Ломаковская Е. Н., Дегтярёв С. Х., Гончар Д. А., Акишев А. Г., Наякшина Т. Н., Шляхова О. И., Куксова А. Н., Хлопова Н. А., Сорокина М. А., Удальева С. Г., Чернухин В. А. СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА НОВОЙ МД-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ИЗ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ЭПИГЕНЕТИКЕ И ОНКОДИАГНОСТИКЕ.....	39
--	----

Максимова Г. А., Ковнер А. В. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ХОЛАНГИОКАРЦИНОМЫ, АССОЦИИРОВАННОЙ С ОПИСТОРХОЗОМ	44
--	----

**Малышев Б. С., Давидович Е. С., Абдурашитов М. А.,
Евдокимов А. А., Сметанникова Н. А., Ситько В. Л.,
Рязанкин И. А., Кузнецов В. В., Акишев А. Г.,
Хасанов Т. Ф., Нетесова Н. А., Дегтярев С. Х. РАЗРАБОТКА
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ СИГНАТУР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА НА РАННИХ СТАДИЯХ48**

**Перфильева А. И. ЭКОЛОГИЧЕСКИ БЕЗОПАСНЫЕ СПОСОБЫ
ОЗДОРОВЛЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ ОТ КОЛЬЦЕВОЙ ГНИЛИ53**

**Проценко М. А. БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА
НА ОСНОВЕ ВЫСШИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ58**

**Пьянова Л. Г., Бакланова О. Н., Седанова А. В., Баринов С. В.,
Баракина О. В., Долгих В. Т. ФОРМОВАННЫЕ УГЛЕРОДНЫЕ
СОРБЕНТЫ ДЛЯ АКУШЕРСТВА И ГИНЕКОЛОГИИ:
СИНТЕЗ, ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ
И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА63**

**Седых С. Е., Принц В. В., Бунева В. Н., Невинский Г. А.
ФАКТОР МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА, СТИМУЛИРУЮЩИЙ
ОБРАЗОВАНИЕ БИСПЕЦИФИЧНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ66**

**Ширяева Е. Н., Абдурашитов М. А., Гончар Д. А., Дегтярёв С. Х.,
Дедков В. С., Ломаковская Е. Н., Михненкова Н. А.,
Мутыло Г. В., Удальева С. Г., Урюмцева Л. А., Чернухин В. А.
КЛОНИРОВАНИЕ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ
НОВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ
M.AGS1, M.ALUB1 И M.FAT1, УЗНАЮЩИХ И УНИКАЛЬНО
МОДИФИЦИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК
TTSA(M6A), (M6A)GCT И (M5C)ATG СООТВЕТСТВЕННО.....68**

**Тайлакова Э. Т., Червякова О. В., Султанкулова К. Т.
ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ
ESCHERICHIA COLI И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ.....71**

Волкова Н. В. ПОЛУЧЕНИЕ БИБЛИОТЕКИ РЕКОМБИНАНТНЫХ
НИТЧАТЫХ БАКТЕРИОФАГОВ M13 ДЛЯ СОЗДАНИЯ
ЭКСПРЕСС ТЕСТ ПОЛОСКИ ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АНТИТЕЛ
ПРОТИВ ГЕПАТИТА С74

Юнусова А. Ю., Кочнева Г. В. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ
ЭФФЕКТ РЕКОМБИНАНТНОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ,
ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО АПОПТИН, НА МОДЕЛИ
ИСКУССТВЕННОГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЯ
КАРЦИНОМЫ A43176

**Жаниязов Ж. А., Даугалиева С. Т., Айткельдиева С. А.,
Свирко Е. А.** *DE NOVO* СБОРКА ГЕНОМА
МИКРООРГАНИЗМОВ ПОЛУЧЕННЫХ
НА ПРИБОРЕ MISEQ ILLUMINA79

Адаменко Л. С., Гуляева М. А., Зайцев С. А., Шестопалов А. М.
РАННЯЯ ДИАГНОСТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ МЕТОДА ИЗМЕРЕНИЯ
ИНДЕКСА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ МОНОНУКЛЕАРОВ
ПЕРЕФЕРИЙНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.....82

ВИРУСОЛОГИЯ

**Алексюк П. Г., Алексюк М. С., Турмагамбетова А. С.,
Богоявленский А. П., Березин В. Э.** МОНИТОРИНГ
ПАРАМИКСОВИРУСОВ ПТИЦ В КАПЧАГАЙСКОМ
ВОДОХРАНИЛИЩЕ.....84

**Байсейіт С. Б., Глебова Т. И., Лукманова Г. В., Кливлеева Н. Г.,
Шаменова М. Г.** ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА
ГРИППА СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ
АКТЮБИНСКОЙ ОБЛАСТИ В 2015 Г.86

Калкожаева М. Қ., Сактаганов Н. Т., Онгарбаева Н. С., Кливлеева Н. Г. ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ГРИППА ПОПУЛЯЦИИ СВИНЕЙ В 2014 Г. В КАЗАХСТАНЕ.....	88
--	-----------

Шпилева О. В. СОЦИАЛЬНО-МЕДИЦИНСКИЕ АСПЕКТЫ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У БОЛЬНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ В ТОМСКОЙ ОБЛАСТИ	90
Турмагамбетова А. С., Алексюк М. С., Богоявленский А. П., Березин В. Э. МЕТАГЕНОМИКА НОВЫХ ПАРАМИКСОВИРУСОВ В ВОДНЫХ ОБРАЗЦАХ КАПЧАГАЙСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА	93

Демидова Е. В., Тарасова М. В., Нетесов С. В. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛНОГЕНОМНОЙ ПЛАЗМИДЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ КОПИЮ ГЕНОМА АДЕНОВИРУСА 6-ГО СЕРОТИПА, ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РАЗРАБОТКЕ СРЕДСТВА ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ	95
---	-----------

Демина А. В., Акопов Г. Д., Терновой В. А., Семенцова А. О., Чаусов Е. В. ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИХ ТЯЖЕЛУЮ ПЕРИНАТАЛЬНУЮ ПАТОЛОГИЮ	97
--	-----------

Ермилова О. С., Белявская В. А. ВАКЦИНОМИКА НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ	99
---	-----------

Филиппова Е. И., Высочина Г. И., Лобанова И. Е., Шалдаева Т. М., Мазуркова Н. А. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ АКТИВНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ <i>IN VIVO</i>	102
--	------------

Иголкин А. С. АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ: СОВРЕМЕННЫЕ АСПЕКТЫ РАСПРОСТРАНЕНИЯ В РФ И СТРАНАХ ВОСТОЧНОЙ ЕВРОПЫ	107
---	------------

Иунихина О. В., Рева Н. В. ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОСЛЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С СУБСТРАТОМ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ..... 112

Kasymbekov Ye. T., Zhumatov K. Kh., Sayatov M. Kh., Kydyrmanov A. I., Karamendin K. O., Asanova S. E., Daulbayeva K. D. ISOLATION OF INFLUENZA A VIRUSES FROM WILD BIRDS IN CENTRAL KAZAKHSTAN IN 2004–2013..... 115

Корнеев Д. В., Попова А. В. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК БАКТЕРИОФАГА AP22 МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ 117

Макаревич Е. В., Скарнович М. О., Седельникова Н. В., Мазуркова Н. А. ВИРУСИНГИБИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ ЛИШАЙНИКА *CETRARIA ISLANDICA* В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА А..... 118

Марченко В. Ю., Суслопаров И. М., Гончарова Н. И., Колосова Н. П., Шиповалов А. В., Ильичева Т. Н., Дурыманов А. Г., Рыжиков А. Б. ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ САХА..... 122

Мазурков О. Ю., Кабанов А. С., Скарнович М. О., Бормотов Н. И., Скарнович М. А., Серова О. А., Шишкина Л. Н., Чернонос А. А. ОЦЕНКА ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИХ И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРОТИВООСПЕННОГО ХИМИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ НИОХ-14..... 126

Овчинникова А. С., Сергеев Ал. А., Титова К. А., Кабанов А. С., Булычев Л. Е., Сергеев Ар. А., Галахова Д. О., Шишкина Л. Н., Таранов О. С., Агафонов А. П., Сергеев А. Н. ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ВИРУСУ ОСПЫ ОБЕЗЬЯН МЫШИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВООСПЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ..... 131

**Сейдалина А. Б., Хан Е. Я., Карамендин К. О.,
Кыдырманов А. И., Даулбаева К. Д., Асанова С. Е.,
Касымбеков Е. Т., Жуматов К. Х., Саятов М. Х. ЦИРКУЛЯЦИЯ
НОВЫХ И ИЗВЕСТНЫХ СЕРОТИПОВ ПАРАМИКСОВИРУСОВ
В ПОПУЛЯЦИЯХ ДИКИХ ПТИЦ НА ТЕРРИТОРИИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН В 2013–2014 ГГ.....**133

**Скарнович М. А., Скарнович М. О., Мазурков О. Ю.,
Шишкина Л. Н. ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ
К ПРОТИВОВИРУСНЫМ ПРЕПАРАТАМ *IN VITRO*
И ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА А(Н3N2),
А(Н1N1), А(Н5N1) И А(Н7N9) *IN VIVO*.....**135

**Ачигечева П. Ю., Никонорова Ю. В., Балахнин С. М.,
Гашникова Н. М. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МТТ-МЕТОДА
ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АНТИ-ВИЧ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....**139

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

**Исмагамбетов Б. М., Богданова М. И., Кошембетов Ж. К.,
Матвеева В. М., Нурабаев С. Ш., Сугирбаева Г. Д.,
Оразымбетова Н. К. РАЗРАБОТКА ОТ-ПЦР
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА.....**142

**Ширшикова Т. В., Камалетдинова Л. Х., Марданова А. М.,
Шарипова М. Р., Богомольная Л. М. ВКЛАД ЭФФЛЮКС
СИСТЕМЫ МАСАВ *SERRATIA MARCESCENS*
В УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ**145

**Ткачёва А. В., Сиволобова Г. Ф., Гражданцева А. А.,
Кочнева Г. В. АНАЛИЗ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ**

РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА MVA ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ГЕН БЕЛКА NS1 ПАРВОВИРУСА	150
---	-----

Волкоморов В. В., Григорьева Е. С., Карбышев М. С., Митрофанова И. В., Кайгородова Е. В., Чердынцева Н. В. ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННОМУ БЕЛКУ РМЕРА1 И АНАЛИЗ ХАРАКТЕРА ЕГО ЭКСПРЕССИИ В ТКАНИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЖЕЛУДКА	154
---	-----

Черепанова А. В., Власов В. В., Лактионов П. П. РОЛЬ БЕЛКА KU В ИНГИБИРУЮЩЕМ ДЕЙСТВИИ ДНК НА ДЦРНК- ЗАВИСИМУЮ АКТИВАЦИЮ NF κ B В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ	158
--	-----

Дорофеева Ю. Б., Салтыкова И. В., Петров В. А., Федосенко С. В., Огородова Л. М., Попенко А. С., Тяхт А. В., Кириллова Н. А., Куликов Е. С., Деев И. А., Говорун В. М., Кострюкова Е. С. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОРОФАРИНГЕАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ ПАЦИЕНТОВ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ	160
---	-----

Габбасов Р., Бикл Л., О'Брайн Ш., Сио С., Литвин С., Големис Э., Бабынин Э., Конолли Д. ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ NEDD9 В ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И ОПУХОЛЕВОМ МИКРООКРУЖЕНИИ НА РАЗВИТИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ	162
---	-----

Григорьева А. Е., Тамкович С. Н., Кабилов М. Р., Еремина А. В. СВОЙСТВА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ СЛЕЗНОЙ ЖИДКОСТИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ	163
--	-----

**Грищенко И. В., Дольский А. А., Кулемзин С. В.,
Пустыльняк В. О., Усдин К., Юдкин Д. В. ИССЛЕДОВАНИЕ
ФОРМИРОВАНИЯ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ДНК В РАЙОНЕ
ЛОМКОГО САЙТА FRAHA У ПАЦИЕНТОВ С СИНДРОМОМ
МАРТИНА-БЕЛЛ167**

**Ибрагимова М. К., Цыганов М. М. , Карабут И. В.
ИНТЕГРАТИВНАЯ И ЭПИСОМАЛЬНАЯ ФОРМЫ ВИРУСА
ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ГЕНОТИПА В ИЗМЕНЕННОМ
ЦЕРВИКАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ.....168**

**Карташов М. Ю., Микрюкова Т. П., Терновой В. А.,
Москвитина Н. С., Локтев В. Б. ИЗУЧЕНИЕ
РАСПРОСТРАНЕНИЯ РИККЕТСИЙ И ИХ ПЕРЕНОСЧИКОВ
НА ТЕРРИТОРИИ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ173**

**Косова А. А., Ходырева С. Н., Лаврик О. И. ФОРМИРОВАНИЕ
НЕОБРАТИМЫХ КОМПЛЕКСОВ С ДНК —
ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ ФУНКЦИЯ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-
ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ178**

**Кравчук О. С., Купрюшкин М. С., Дмитриенко Е. В.
ИССЛЕДОВАНИЕ СУБСТРАТНЫХ СВОЙСТВ
ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ
ДНК- ПРОЦЕССИРУЮЩИМИ ФЕРМЕНТАМИ.....180**

**Кургина Т. А., Анарбаев Р. О., Лаврик О. И. ОПРЕДЕЛЕНИЕ
АКТИВНОСТИ ПРИРОДНОГО МУТАНТА ТИРОЗИЛ-ДНК-
ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 (SCAN1)
НА МОДЕЛЬНЫХ ДНК-СУБСТРАТАХ183**

**Меньшанов П. Н., Акулов А. Е. ЭФФЕКТЫ ИЗОФЛУРАНА
И ДРУГИХ АНЕСТЕТИКОВ НА УРОВЕНЬ КЛЮЧЕВЫХ
МЕТАБОЛИТОВ В ГИППОКАМПЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КРЫС185**

**Никитина Е. Г., Черемисина О. В., Литвяков Н. В. МИКРОРНК
СЛЮНЫ В ДИАГНОСТИКЕ ПАТОЛОГИЙ ГОРТАНИ.....187**

**Рудомётов А. П., Щербаков Д. Н.,
Бакулина А. Ю. КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОГЕНА
ПРОТИВ ВИЧ-1, ВКЛЮЧАЮЩЕГО ЭПИТОП
ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА 10E8.....189**

**Щербакова Н. С., Рудометов А. П., Орешкова С. Ф.,
Карпенко Л. И. ENV-ПСЕВДОВИРУСЫ ВИЧ-1, ПОЛУЧЕННЫЕ
ИЗ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ
НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ.....191**

**Кожабергенов Н. С., Строчков В. М., Бурашев Е. Д.,
Шораева К. А., Султанкулова К. Т. РАЗРАБОТКА БИОЧИПА
НА ОСНОВЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ЗОНДОВ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПТИЦ193**

**Сухарева Е. В., Ланшаков Д. А. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ
РАННЕГО ОТВЕТА C-FOS И C-JUN В ОТДЕЛАХ
НЕОНАТАЛЬНОГО МОЗГА КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ
ДЕКСАМЕТАЗОНА.....195**

**Троицкая О. С., Ткаченко А. В., Коваль О. А. АКТИВАЦИЯ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЕКОМБИНАНТНЫМ
АНАЛОГОМ ЛАКТАПИНА197**

**Цыганов М. М., Ибрагимова М. К., Казанцева П. В.,
Слонимская Е. М., Чердынцева Н. В., Литвяков Н. В.
ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ В РЕГУЛЯЦИИ
ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ
УСТОЙЧИВОСТИ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ199**

**Волкова А. В., Ломзов А. А., Купрюшкин М. С.,
Дмитриенко Е. В. ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ГЕТЕРОФАЗНОМ ВАРИАНТЕ**

С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВЫХ НЕЗАРЯЖЕННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	204
---	-----

Зыбкина А. В., Щербакова Н. С., Щербаков Д. Н. СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЙ СБОРКУ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ, ЭКСПОНИРУЮЩИХ НА ПОВЕРХНОСТИ GP ВИРУСА ЭБОЛА	206
---	-----

Белая С. А. АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОГО СХОДСТВА ГЕНОВ 16 ПОДСЕМЕЙСТВ ЦИТОХРОМОВ P450 6-ГО СЕМЕЙСТВА (CYP6) В РАЗНЫХ ОТРЯДАХ НАСЕКОМЫХ	208
---	-----

Научное издание

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

Сборник тезисов

Верстка А. С. Терешкиной

Подписано в печать 14.09.2015 г.
Формат 60 x 84 1/16. Уч.-изд. л. 14. Усл. печ. л. 13.
Тираж 150 экз. Заказ №
Редакционно-издательский центр НГУ
630090, Новосибирск-90, ул. Пирогова, 2.