



ФБУН ГНЦ ВБ "ВЕКТОР"



ИННОВАЦИОННЫЙ
ЦЕНТР КОЛЬЦОВО



НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО



БИОТЕХНОПАРК
КОЛЬЦОВО



БИОФАРМ



KOLTSOVO / 2017

OPEN
BIO

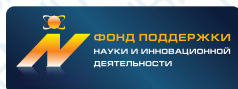
ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

СБОРНИК

ТЕЗИСОВ

IV МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО - 2017



N* Новосибирский
государственный
университет
*НАСТОЯЩАЯ НАУКА



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

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2017

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

М431 IV Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов – 2017 : Сб. тез. / Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2017. – 332 с.

ISBN 978-5-4437-0687-0

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-2017.

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 978-5-4437-0687-0

© АНО «Инновационный центр
Кольцово», 2017

Раздел 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ
ПРОХИМОЗИНОВ *VICUGNA PACOS* И *CAMELUS FERUS*
В СИСТЕМЕ *E. COLI***

**THE PRODUCTION OF RECOMBINANT ANALOGUES
PROCHYMOSIN *VICUGNA PACOS* AND *CAMELUS*
FERUS IN *E. COLI***

С.В. Беленькая ¹, В.В. Ельчанинов ², Д.Н. Щербаков ¹

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

² *Государственное научное учреждение
Сибирский НИИ сыроделия*

Аннотация

Рекомбинантный химозин телянка один из самых востребованных коммерческих ферментов, он применяется в сыродельной отрасли, для коагуляции молока. Несмотря на то, что первые рекомбинантные аналоги химозина телянка были получены в 80-х годах прошлого века, в настоящее время продолжают работы по совершенствованию (модификации) существующих и поиску новых молоко-свертывающих ферментов. Для поиска кандидатных рекомбинантных химозинов с улучшенными, по сравнению с химозином телянка, технологическими характеристиками были использованы методы биоинформатического анализа. Итогом работы стало получение препаратов рекомбинантных химозинов *Camelus ferus* и *Vicugna pacos*.

Abstract

Recombinant prochymosine of a calf is one of the most demanded commercial enzymes. It's used in the cheese making industry and milk coagulation. Despite of that the first recombinant analogs of calf chymosine were obtained in 80s, nowa-

days there are constant investigations targeted on improving present enzymes and finding new milk-coagulating enzymes. When we were searching candidate recombinant chymosins with enhanced technological characteristics, comparing to calf chymosine, we used on a bioinformatic analysis method. As a result, we the receipt of preparations of recombinant chymosins *Camelus ferus* and *Vicugna pacos*.

Химозин – это фермент класса аспарогоиновых протеаз, обеспечивающий протеолитическое расщепление связи между фенилаланином и метеонином (в положении 105-106) белка каппа-казеина молока с образованием молочного сгустка. В организме млекопитающих он синтезируется клетками оболочки желудка в виде препрохимозина, который секретируется в пространство желудка в виде неактивного зимогена – прохимозина. В кислой среде желудка, происходит его автокаталитическая активация в активную форму – химозин [1]. Химозин обладает высокоспецифичной молокосвертывающей и низкой побочной протеолитической активностью, соотношение этих показателей определяют качественную характеристику любого молочного коагулянта [2]. В настоящее время, при изготовлении сыров, за эталон взят бычий химозин. Однако его биохимические и технологические характеристики могут быть улучшены, что продемонстрировано на примере рекомбинантного химозина *Camelus dromedarius*. Установлено, что для свертывания одного и того же объема молока, расход рекомбинантного химозина верблюда (по сравнению с рекомбинантным химозином коровы) на 70-80 % ниже [3]. Таким образом, задача получения новых рекомбинантных химозинов с улучшенными биохимическими и технологическими показателями, является актуальной. Причем, речь идет не только о модификации рекомбинантного бычьего химозина (*Bos taurus*), но и о рекомбинантных химозинах других видов млекопитающих.

В ходе работы был проведен теоретический анализ последовательностей прохимозинов, представленных в GenBank. На основе этого анализа были отобраны варианты прохимозинов, обладающих наибольшим сходством аминокислотной последовательности с прохимозином *Camelus dromedaries*. На их основе спроектированы экспрессионные кассеты, оптимизированные для системы *E. coli*. Сконструирована серия векторов, содержащих разработанные экспрессионные кассеты и обеспечивающих высокоэффективный синтез рекомбинантных прохимозинов. С использованием методов геной инженерии были получены продуценты рекомбинантных прохимозинов *Vicugna pacos* и *Camelus ferus* на основе штамма BL21(DE3) *E. coli*. После наработки достаточ-

ного количества фермента была определена молокосвертывающая активность полученных препаратов. Анализ показал, что молокосвертывающая активность препаратов на основе химозина *Vicugna pacos* почти в два раза выше, чем препаратов на основе *Bos taurus* и *Camelus ferus*, которые в нашем эксперименте показали сходный уровень активности (табл. 1).

Таблица 1

**Молокосвертывающая активность (МА)
рекомбинантных белков**

Название препарата	МА, усл. ед./мг белка (X±m)	МА, IMCU/мг (X±m)
ProChymBos	17040,00 ± 3,32	131,99 ± 0,03
ProChymVic	29207,00 ± 121,80	226,24 ± 0,94
ProChymCam	17361,00 ± 24,65	134,48 ± 0,19

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанные рекомбинантные продуценты могут быть привлекательными для производства рекомбинантных химозинов на биотехнологических предприятиях.

Литература

1. Foltman B. A review on prorennin and rennin // Compt Rend Trav Lab Carlsberg. 1966. № 35. P. 143–231.
2. Fox P.F. // Rennets and their action in cheese manufacture and ripening. Biotechnol Appl Biochem. 1988. №. 10. P 522–535.
3. .Kappeler S.R., H. van den Brink J., Rahbek-Nielsen H., Farah Z., Puhan Z., Hansen E.B., Johansen E. Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk // Biochem Biophys Res Commun. 2006. №. 342. P. 647–654.

ПОЛУЧЕНИЕ КАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ НЕЙЛОНА-6*

PREPARATION OF CAPSULATED FORMS OF DOXORUBICIN BASED ON NYLON-6

Е.Н. Бобрикова^{1,2}, К.В. Разум¹, Е.В. Дмитриенко^{1,2}

¹ *Институт химической биологии*

и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

E.N. Bobrikova^{1,2}, K.V. Razum¹, E.V. Dmitrienko^{1,2}

¹ *Institute of chemical biology and fundamental medicine,*

Siberian Division of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

² *Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia*

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

Аннотация

Цитостатики – широко распространенные препараты для лечения онкологических заболеваний, они обладают высокой токсичностью и низким уровнем усвояемости (менее 20 %). Использование капсулированных форм цитостатических препаратов может позволить увеличить эффективность и снизить токсичность препаратов. В качестве кандидатов для получения таких конструкций могут выступать молекулярно-импринтированные полимеры (МИП) [1]. В данной работе были получены и исследованы капсулированные формы цитостатика – доксорубицина. Определен размер полученных частиц, а также оптимальные условия загрузки препарата и емкость полимеров. Исследована эффективность и скорость высвобождения доксорубицина из полимерного каркаса в различных условиях.

Abstract

Cytotoxic agents – widespread drugs for the treatment of cancer, they have high toxicity and low digestibility (less than 20 %). Using capsulated forms of cytotoxic drugs can increase the effectiveness and reduce the toxicity of drugs. As candidates for the

* Работа выполнена в рамках государственного задания и при поддержке программы Президиума РАН ФИМТ – 2014 – 154.

preparation of such structures can be molecular imprinted polymers (MIPs). In this work, the capsulated forms of cytotoxic agent – doxorubicin have been obtained and studied. The size of the particles obtained, as well as the optimum loading conditions for the preparation, and the capacity of the polymers were determined. The efficacy and rate of release of doxorubicin from a polymeric matrix under various conditions has been studied.

В настоящее время молекулярный импринтинг является бурно развивающимся научным направлением. Молекулярно-импринтированные полимеры (МИПы) – полимеры, содержащие в своей структуре отпечатки молекул-шаблонов, использованных при формировании полимерного каркаса, и способные к их специфическому связыванию.

Ранее в ЛБМХ ИХБФМ был разработан универсальный способ получения МИПов на основе нейлона-6. Данный способ базируется на использовании растворимого полимерного каркаса, который, в зависимости от условий растворения и осаждения, изменяет структурную организацию полимерного матрикса при переходе из растворенного в твердотельное состояние, а при добавлении молекулы-шаблона формирует сайты специфического распознавания и образует МИП [2].

МИПы могут быть использованы для создания сенсоров, сорбентов, катализаторов, терапевтических агентов, одно из перспективных направлений – это использование МИПов в качестве доставщиков лекарственных средств [3].

На данном этапе развития клинической и экспериментальной онкологии основным лечением является использование полихимиотерапии (ПХТ), включающей несколько цитостатиков с различным механизмом действия и токсическим профилем. Однако имеется ряд факторов, ограничивающих полноценное и максимально эффективное использование программной ПХТ – это выраженная токсичность цитостатической терапии, а также формирование в опухоли множественной лекарственной устойчивости за счет гиперэкспрессии гена MDR, кодирующего трансмембранный белок Р-гликопротеин, а также нарушения механизмов апоптоза в опухолевых клетках. Одним из часто используемых цитостатиков является доксорубин. Доксорубин – классический интеркалятор, т. е. обладает высокой способностью встраиваться между двумя нитями молекулы ДНК, за счет реакции с пуриновым и пиримидиновым основаниями. В результате этой реакции образуется прочный комплекс ДНК-антрациклин, что ведет к изменению структуры и функции ДНК, нарушению ее матричной активности в процессе репликации и транскрипции. Однако было показано, что концентрации доксорубина, необходимые для противоопухолевого эф-

фекта в соответствии с этим механизмом, должны быть значительно выше, чем те, которые получаются при применении терапевтических доз. Кроме этого доксорубицин очень токсичен, а усваиваемость его менее 20 %.

Использование цитостатических препаратов в комбинации с молекулярно-импринтированными полимерами может повысить эффективность и снизить неблагоприятные эффекты стандартной химиотерапии за счет капсулирования цитостатика и его контролируемого высвобождения.

Для использования МИПов в качестве терапевтических агентов и систем доставки лекарственных препаратов необходимо учитывать следующие требования к материалу:

- ✓ биосовместимость и отсутствие токсичности,
- ✓ размер и монодисперсность частиц и/или полимерной матрицы,
- ✓ аффинность и ёмкость полимера,
- ✓ эффективность и скорость извлечения препарата.

Известно, что нейлон-6 не токсичный, биodeградируемый материал. Ранее в лаборатории было показано, что и капсулы, и мембраны из него, так же не обладают цитотоксичностью. Кроме того частицы из нейлона-6 способны проникать внутрь клеток, не оказывая влияния на их жизнедеятельность. Таким образом, целью данной работы было получение капсулированных форм доксорубицина на основе нейлона-6 по авторской технологии и исследование эффективности загрузки и высвобождения цитостатика в различных условиях.

В ходе работы было апробировано два варианта получения капсулированного доксорубицина:

1. импринтинг – совместное соосложение полимера (нейлон-6) и молекулы-шаблона (доксорубицина);
2. сорбция – получение капсул из нейлона-6 в качестве высокоэффективного сорбента.

В первом случае, при импринтинге использовали разные концентрации доксорубицина и были определены оптимальные условия загрузки и первичного высвобождения препарата, ёмкость полимера и параметры десорбции доксорубицина, а также получены параметры вторичного связывания МИПа с доксорубицином и его последующего высвобождения. После полного удаления доксорубицина из полимерного каркаса была проведена повторная загрузка препарата и определены следующие характеристики: оптимальные условия загрузки, эффективность и скорость вымывания цитостатика, а так же ёмкость полимеров.

Во втором случае частицы из нейлона-6 были синтезированы по авторской методике [4], и в дальнейшем использовались в качестве высокоэффективного сорбента. Частицы были охарактеризованы (размер, дзетта

потенциал) методами динамического светорассеивания (Malvern, UK), оптической и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Загрузку частиц доксорубицином проводили, варьируя концентрацию, состав раствора препарата, pH среды. Параметры высвобождения цитостатика исследовали в различных условиях, в том числе и в растворах симулирующих биологические жидкости. Были определены оптимальные условия для загрузки и высвобождения доксорубицина, эффективность и скорость его высвобождения, емкость частиц.

Таким образом, в ходе работы получены и охарактеризованы капсулированные формы доксорубицина. Определены размер частиц, оптимальные условия загрузки препарата и емкость полимеров. Исследована эффективность и скорость высвобождения доксорубицина в различных условиях. На данном этапе ведутся активные цитологические работы, которые позволяют определить эффективность капсулированных форм доксорубицина.

Литература

1. Wang P. et al. Molecularly imprinted layer-coated hollow polysaccharide microcapsules toward gate-controlled release of water-soluble drugs // RSC Advances. 2014. Т. 4. № 50. С. 26063–26073.
2. Dmitrienko E.V. et al. A simple approach to prepare molecularly imprinted polymers from nylon-6 // Journal of Molecular Recognition. 2013. Т. 26. № 8. С. 368–375.
3. Zaidi S.A. Latest trends in molecular imprinted polymer based drug delivery systems // RSC Advances. 2016. Т. 6. № 91. С. 88807–88819.
4. Дмитриенко Е.В., Пышная И.А., Рогоза А.В., Пышный Д.В. Способ получения молекулярно-импринтированных полимеров // Патент РФ № 2385889 от 10.04.2010.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭНДОТОКСИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

THE RECOMBINANT ENDOTOXIN BINDING PROTEIN PRODUCTION

O.B. Боковая^{1,2}, В.В. Морозова¹, И.К. Байков¹, Н.В. Тикунова¹

¹ *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *ФГАОУ ВПО Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет, Новосибирск, Россия*

O.V. Bokovaya^{1,2}, V.V. Morozova¹, I.K. Baykov¹, N.V. Tikunova¹

¹ *ICBFM SB RAS, Russia, Novosibirsk*
² *Novosibirsk state university, Russia, Novosibirsk*

Аннотация

При производстве лекарственных биотехнологических субстанций после стадий очистки целевой продукт должен иметь очень низкое содержание эндотоксинов, что связано с их пирогенными свойствами для организма. В связи с этим необходимо создание эффективной, доступной и простой технологии очистки от эндотоксинов. Так как хвостовые белки бактериофагов являются природными лигандами бактериальных эндотоксинов, что позволит производить эффективную сорбцию эндотоксинов из биотехнологических субстанций. Из коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур были выбраны 3 бактериофага с поливалентной специфичностью. Было проведено полногеномное секвенирование их геномов, и была установлена родовая принадлежность. Используя хвостовые белки этих бактериофагов, в данный момент производится создание плазмидных конструкций.

Abstract

In the manufacture of medicinal biotechnological substances the product should have a very low content of endotoxins due to their pyrogenic properties to the body. In this regard it is necessary to create effective, affordable and simple technology of purification from endotoxins. As the bacteriophages tail proteins are natural ligands of bacterial endotoxin that will provide effective adsorption of endotoxin from biotechnological substances. From the Collection of Extremophile Microorganisms and Type Cultures were selected 3 bacteriophages with polyvalent specificity. The whole genome sequencing of their genomes was conducted and tribal affiliation was established. In the moment the creation of plasmid constructs is carries out using tail proteins of these phages.

Объемы производства рекомбинантных белков растут с каждым годом. Потребность в таких биотехнологических субстанциях связана с интенсивным развитием отрасли биотехнологий в мире и в России в том числе. По оценкам рынка биотехнологий компанией Frost & Sullivan в 2014 году объем рынка биотехнологии составил 270 млрд долларов в 2013 году и по прогнозам к 2020 году составит 600 млрд долларов. При этом, на биофармацевтику приходится около 60 % объема мирового рынка. Это значит, что производство гормонов, вакцин, антибиотиков, факторов свёртывания крови и некоторых других биотехнологических субстанций активно растет и развивается.

При лабораторном, пилотном, а также промышленном производстве биотехнологических препаратов затраты на очистку целевой субстанции от примесей составляют более половины от суммарных затрат. При очистке целевых белков из культивируемых бактериальных штаммов-продуцентов одним из основных типов вредных примесей являются липополисахариды (ЛПС), называемые также бактериальными эндотоксинами. Для лекарственных субстанций и препаратов существуют определённые нормы на содержание бактериальных ЛПС.

Хвостовые белки многих бактериофагов являются природными белками, прочно связывающимися с липополисахаридами бактериальной стенки. Поэтому очистка от бактериальных липополисахаридов (эндотоксинов) с помощью аффинных сорбентов, содержащих хвостовые белки бактериофагов, обладает высокой эффективностью, и этот подход успешно применяется в мире для лабораторной и промышленной очистки различных препаратов от липополисахаридов. Одним из примеров является линия продуктов EndoTrap (Hyglos, Германия, <http://www.hyglos.de>), эффективность которых была неоднократно продемонстрирована. В то же время, в РФ отсутствуют подобные сорбенты и фильтры на их основе, и создание отечественного аналога является востребованным.

В коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур лаборатории молекулярной микробиологии имеется 11 бактериофагов, специфичных к штаммам *E. coli* и родственных ему организмов. Среди них были выявлены 3 фага с поливалентной специфичностью к имеющимся рекомбинантным штаммам. Были проведены электронно-микроскопическое исследование наработанных препаратов фагов и полногеномное секвенирование геномов бактериофагов. Анализ полученных последовательностей и морфология вирионов выявили, что два бактериофага Ph21 и Ph36 относятся к одному роду *T4virus* (семейство *Myoviridae*), но значительно отличаются по нуклеотидной последовательности. А бактериофаг Ph17 относится к роду *T5virus* (семейство *Siphoviridae*). В геномах всех трех фагов были определены потенциальные эндотоксин-связывающие белки и их белки-шапероны. В настоящее время создаются плазмидные конструкции, с использованием которых будут получены рекомбинантные эндотоксин-связывающие белки.

**НАБОР ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ
МИКРОСПОРИИ (*MICROSPORUM CANIS*)
В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ**

**A SET FOR PCR-DETECTION OF THE PATHOGEN
MICROSPORIA (*MICROSPORUM CANIS*)
IN A CLINICAL MATERIAL**

А.З. Габбасов, Т.Н. Титова

*ФГБОУ ВО Министерства здравоохранения России
«Башкирский государственный медицинский университет», Россия*

A.Z. Gabbasov, T.N. Titova

FGBOU in BSMU Ministrava of Russia

e-mail: gabbasova_ainur@mail.ru

Аннотация

На данный момент для диагностики зооантропонозной инфекции используют рутинные методы (микроскопические, бактериологические, физические и т. д.), которые дают результаты, но они не точные, требуют время для обработки результатов. Решение проблемы – ПЦР-детекция характеризующихся исключительно высокой чувствительностью и специфичностью, при этом снижены временные и экономические затраты.

Abstract

At the moment, routine methods (microscopic, bacteriological, physical, etc.) are used to diagnose zoonanthropous infection, which yield results, but they are not exact, it takes time to process the results. Solution of the problem – PCR detection is characterized by exceptionally high sensitivity and specificity, while reducing time and economic costs.

Краткое описание

Набор для ПЦР-детекции возбудителя зооантропонозной дермато-микоза (*Microsporium canis*) в клиническом материале разработан со-

трудниками кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Площадка для организации и масштабирования производства – ООО МИП «Биоскрин».

Дерматомикозы относятся к числу наиболее распространенных инфекций человека. Среди них особенно для Республики Башкортостан актуальна микроспория, которая занимает второе место после микозов стоп. По данным клинической лаборатории РКВД г. Уфа в этиологической структуре дерматомикоза преобладает *M.canis*.

При подозрении на микроспорию основным методом лабораторной диагностики, как и при других дерматомикозах, является обнаружение возбудителя в исследуемом материале (частички кожи и волосы). Регламентированными методами до настоящего времени являются:

1. микроскопия клинического материала;
2. культуральный метод.

Однако используемые методы имеют ряд существенных недостатков.

1. Микроскопия клинического материала не позволяет идентифицировать грибы в патологическом материале до вида по их морфологии. Кроме того чувствительность этого метода недостаточна

2. Культуральный метод исследования является очень трудоемким и занимает от 5 до 30 дней. При этом специфичность и чувствительность этого метода также не достаточна. Стоимость микологического исследования составляет 800-1000 руб.

Благодаря использованию ПЦР, время, необходимое для постановки диагноза и начала лечения сокращается до 3-4 часов. Себестоимость исследования при этом существенно снижается ниже (стоимость набора на 100 образцов 1500–2000 руб). Следует отметить, что диагностическая эффективность метода ПЦР выше на 9,8 % по сравнению с микроскопическим методом и на 17,1 % – культуральным.

Иные материалы

Набор реагентов максимальной комплектации предназначен для полного анализа, включая выделение ДНК из клинического материала, проведение ПЦР и детекции результатов методом электрофореза в агарозном геле.



Фото 1.



Фото 2.

Комплекты реагентов для ПЦР-детекции возбудителя микроспории (*M.canis*) в клиническом материале выпускаются в различных форматах в зависимости от количества реакций (фото 1).

– реакционная смесь – требуется предварительное смешение компонентов (фото 1)

– готовая реакционная смесь для амплификации под слоем парафина – полностью готовые к применению смеси расфасованные в индивидуальные пробирки, требуется только добавить анализируемую пробу (фото 2).

ПОДБОР АГАРИЗОВАННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННОГО НЕНАПРАВЛЕННОГО УФ-МУТАГЕНЕЗА ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТАКРОЛИМУСА

SELECTION OF THE NUTRIENT AGAR MEDIUM FOR INDUCED UR-MUTAGENESIS OF TACROLIMUS PRODUCING STRAIN

В.И. Глаголев¹, Е.Д. Воскресенская², В.В. Джавахия²

¹ *Российский химико-технологический университет
им. Д.И. Менделеева (ПХТУ), Россия*

² *ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Россия*

V.I. Glagolev¹, E.D. Voskresenskaya², V.V. Dzhavakhiya²

¹ *Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Russia*

² *Research Center of Biotechnology RAS, Russia*

Аннотация

Такролимус (FK506) используется для лечения отторжения трансплантатов органов и тканей [1]. Среди различных коммерчески доступных иммунодепрессантов (циклоспорин, рапамицин, и мофетил), FK506 является одним из наиболее сильнодействующих иммуносупрессивных агентов. Выпускаемый фирмой «Astellas» под названием Prograf[®] такролимус, занимал 27,6 % годовой продажи рынка иммунодепрессантов в 2011 [2]. В последнее время FK506 также используется для лечения атопического дерматита и аутоиммунных нарушений организма [3].

FK506 был впервые выделен из актиномицета *St. tsukubaensis* в 1987 году. Одним из самых существенных недостатков современных технологий микробиологического синтеза такролимуса является низкий уровень биосинтетической активности, ее нестабильность у большинства известных штаммов-продуцентов, а также их выраженная диссоциация и фенотипическая изменчивость.

Целью данной работы являлось подбор оптимальной агаризованной среды для проведения индуцированного ненаправленного мутагенеза штамма-продуцента такролимуса.

Abstract

Tacrolimus (FK506) is used to treat the rejection of organ and tissue transplants [1]. Among the various commercial benefits of immunosuppressants (cyclosporine, rapamycin, and mofetil), FK506 is one of the most potent immunosuppressive agents. Produced

by Astellas under the name Prograf © tacrolimus, it held 27.6 % of the annual sales of the immunosuppressant market in 2011 [2]. Recently, FK506 has also been used to apply atopic dermatitis and autoimmune disorders of the body [3].

FK506 was first isolated from the antinomies *St. tsukubaensis* in 1987. One of the most significant shortcomings of modern technology of microbiological synthesis of tacrolimus is a low level of biosynthetic activity, its instability in all known producer strains, as well as their pronounced dissociation and phenotypic variability.

The purpose of this work was to select the optimal agar medium for carrying out the induced non-directional mutagenesis of the tacrolimus producing strain.

Материалы и методы

Продуцент такролимуса и среда для культивирования. В качестве исходного штамма использовали штамм *St. tsukubaensis* DSM 42081, продуктивность которого составляла 0.1 г/л такролимуса. Для выращивания, поддержания и хранения штамма использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): агар-агар – 20.0, мальт экстракт – 15.0, дрожжевой экстракт – 5.0, растворимый крахмал – 5.0, CaCO₃ – 3.0, дистиллированная вода – до 1000 (рН – 6.8-7.0). Исходный штамм культивировали в термостатируемом шкафу при температуре 28°C в течение 5-7 суток. На используемой агаризованной среде исходная культура *St. tsukubaensis* образует округлые колонии, воздушный мицелий белого цвета, споры чёрные, гладкие, профиль колонии плоский, выросший в агар, структура однородная, размер колоний 3-4 мм.

УФ-мутагенез. Для проведения мутагенеза мицелий 5-7-дневной культуры смывали с поверхности агаризованной среды стерильной водой и фильтровали через ватный фильтр для отделения крупных конгломератов мицелия. Затем суспензию фильтровали через стеклянный фильтр (размер пор – 100 мкм) для получения равномерной суспензии спор и мелких фрагментов мицелия и облучали коротковолновой ультрафиолетовой (100-280 нм) лампой Short Wave Ultra-violet Mineralight (США) мощностью 12.5 Вт. Расстояние от источника облучения до обрабатываемой суспензии составляло 25 и 40 см.

После проведения индуцированного ненаправленного мутагенеза, отобранные пробы разводили так, чтобы на чашках Петри с агаризованными средами после их посева не образовывалось более 100 колоний. Для подсчёта выживаемости, а также выявления морфологически изменённых колоний использовались агаризованные среды ISP4, МДА, Чапека, КГА. Состав сред указан в табл. 1.

Таблица 1

Состав агаризованных питательных сред

	Состав среды, г/л			
	ISP4	МДА	Чапекa	КГА
Крахмал растворимый	10	10	–	–
Дрожжевой экстракт	–	4	–	–
Солодовый экстракт	–	10	–	–
Сахароза	–	–	30	–
Картофель	–	–	–	200
Глюкоза	–	–	–	20
NaNO ₃	–	–	2	–
KCl	–	–	0,5	–
K ₂ HPO ₄	1	–	1	–
MgSO ₄	1	–	0,5	–
NaCl	1	–	–	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	–	–	–
CaCO ₃	2	–	–	–
FeSO ₄	0,001	–	0,01	–
MnCl ₂	0,001	–	–	–
ZnSO ₄	0,001	–	–	–
Агар-агар	20	20	15	20

Результаты

Выживаемость и частота проявления морфологических мутаций являлись главными критериями для отбора агаризованной среды для проведения индуцированного ненаправленного мутагенеза штамма-продуцента такролимуса. Степень выживаемости определяли, как отношение числа выросших колоний после проведения мутагенеза, к количеству колоний до его проведения. Частоту проявления мутаций определяли, как отношение числа колоний с изменённой морфологией (по сравнению с морфологией контрольных колоний), к числу колоний не изменивших свою морфологию.

В результате эксперимента было получено, что наивысшая выживаемость колоний наблюдается при проведении индуцированного ненаправленного мутагенеза на агаризованной питательной среде ISP4, в тоже время наибольшее число морфологически изменённых изолятов наблюдалось на агаризованной питательной среде КГА. На данной среде было обнаружено 4 различных морфологических форм колоний, отличающихся друг от друга не только скоростью роста, но различной пигментацией. Все виды возникающих морфологических форм были протестированы на уровень биосинтеза такролимуса при глубинном культивировании.

Вывод

В результате проделанной работы была определена оптимальная агаризованная питательная среда КГА для проведения индуцированного-ненаправленного мутагенеза штамма *St. tsukubaensis* DSM 42081. Данная среда была выбрана, так как основной целью данной работы являлось получение колоний с изменённой морфологией. Частота возникновения морфологически изменённых изолятов является косвенным признаком эффективности УФ-мутагенеза, что, в свою очередь, может коррелировать с появлением колоний с повышенной продуктивностью.

Литература

1. Haddad E. et al. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients // The Cochrane Library. 2006.
2. Mo S.J., Yang H.S. Development of FK506-hyperproducing strain and optimization of culture conditions in solid-state fermentation for the hyperproduction of FK506 // Journal of Applied Biological Chemistry. 2016. Т. 59. № 4. С. 289–298.
3. Barreiro C., Martínez-Castro M. Trends in the biosynthesis and production of the immunosuppressant tacrolimus (FK506) // Applied microbiology and biotechnology. 2014. Т. 98. № 2. С. 497–507.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ESCHERICHIA COLI BL21 DE3 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ
БЕЗМЕТИОНИНОВОГО ИНТЕРФЕРОНА АЛЬФА – 2b**

**OPTIMIZATION OF *ESCHERICHIA COLI* BL21 DE3 CULTURE
CONDITIONS FOR PRODUCTION INTERFERON ALPHA-2b WITHOUT
N-TERMINAL METHIONINE**

А.Ф. Елгина, Я.А. Забродская, Е.В. Демьянова, В.И. Батарин,
В.И. Лисицкая, Е.А. Протасов, А.М. Ищенко

ФГУП «Гос. НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России

e-mail: alienv@inbox.ru

Аннотация

В ходе данной работы было изучено влияние условий культивирования (температура; аэрация; состав питательной среды) на наличие интерферона α -2b с формилметионином на N-конце. Показано, что снижение температуры культивирования с 37 до 25 °C во время индукции способствует биосинтезу растворимой формы интерферона α -2b без формилметионина на N-конце.

Abstract

In the course of this work, the influence of culture conditions (temperature, aeration, composition of the nutrient medium) on the presence of interferon α -2b with N-terminal formylmethionine has been studied. It was shown that decreasing the culture temperature from 37 to 25 °C during induction promotes the biosynthesis of the soluble form of interferon α -2b without N-terminal formylmethionine.

При суперэкспрессии рекомбинантного интерферона α -2b (IFN α -2b) в клетках *Escherichia coli* BL21 DE3 происходит накопление двух форм интерферона с формилметионином на N-конце (IFN met α -2b) и без него. Согласно требованиям Европейской фармакопеи (EPH) молекула рекомбинантного человеческого интерферона альфа-2b должна соответствовать нативной, которая состоит из 165 аминокислот с N-концевым цистеином, связанным дисульфидной связью с парным ей 98-м цистеином [1]. Формилированный метионин с N-конца может удаляться собственными ферментами *Escherichia coli*: пептидил-деформилаза удаляет остаток муравьиной

кислоты с метионина, а метионинаминопептидаза удаляет сам N-концевой метионин [2]. Однако в условиях суперсинтеза полного удаления формилметионина не происходит. На настоящий момент данная проблема решалась за счет создания новых генетических конструкций [3] или дополнительной обработкой специфическими ферментами [4], что является довольно дорогостоящими и трудоемкими процессами.

Целью данной работы являлась оптимизация условий культивирования *Escherichia coli* BL21 DE3 для получения IFN α -2b без формилметионина на N-конце.

Стандартные условия культивирования в колбе вместимостью 2 л: рабочий объем 250 мл, температура 37 °С, перемешивание 180 об/мин, $\varphi_{\text{загр.}} = 0,125$, питательная среда 1,5LB+M9⁺, стрептомицин 0,5 г/л, начальная концентрация клеток = 0,3 ОП₅₄₀, индукция 0,7 % лактозой при концентрации клеток = 3 ОП₅₄₀, при выходе на стационарную фазу культивирование прекращали. Стандартные условия культивирования в ферментере BioFlo 110 (New Brunswick) 14 л: рабочий объем 10 л, температура 37 °С, концентрацию растворенного кислорода поддерживали на уровне 40 % за счет автоматического регулирования оборотов мешалки (150-1200 об/мин) и ручного регулирования расхода воздуха (5–20 л/мин), питательная среда 1,5LB+M9⁺, стрептомицин 0,5 г/л, начальная концентрация клеток = 0,6 ОП₅₄₀, индукция 0,68 % лактозой при концентрации клеток = 15 ОП₅₄₀, автоматическое поддержание pH 6,9±0,2, через 3 часа после внесения индуктора культивирование прекращали. Выделение интерферона из телец включения (ТВ) осуществляли по следующей методике. Клетки центрифугировали, обрабатывали лизоцимом (0,1 мг/мл) и ДНК-азой в присутствии ионов Mg²⁺. Далее ТВ отмывали в буфере (10 mM Трис HCl +10 mM ЭДТА, 1 % метионина, pH 7,6-7,8), растворах с мочевиной и изопропанолом. Денатурировали ТВ с помощью 8 M гуHCl и DTT. Ренатурировали разбавлением денатурата в 20 раз в буфере, содержащем 0,5 M L-аргинин, глутоксим, pH 7,9-8,1. Затем проводили сульфатаммонийное осаждение. (70 % (NH₄)₂SO₄). Хроматографическую очистку проводили на фенолсефарозе. Наличие IFN met α -2b определяли с помощью ВЭЖХ в обратной фазе на колонке Phenomenex Jupiter C18 (градиент ацетонитрила 30 % – 70 % в 0,1 % ТФУ, скорость потока 1,5 мл/мин, температура +35 °С) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм.

При стандартных условиях культивирования в колбе и в ферментере целевой белок накапливался в виде ТВ, включающих две формы интерферона с формилметионином на N-конце и без него. При проведении ОФ-ВЭЖХ пики IFN α -2b и IFN met α -2b не разделялись (рис. 1). Также при ОФ-ВЭЖХ детектировались пики окисленных форм IFN α -2b и IFN

met α -2b, в связи с этим о наличии IFN met α -2b судили по присутствию на хроматограмме второго пика окисленной формы.

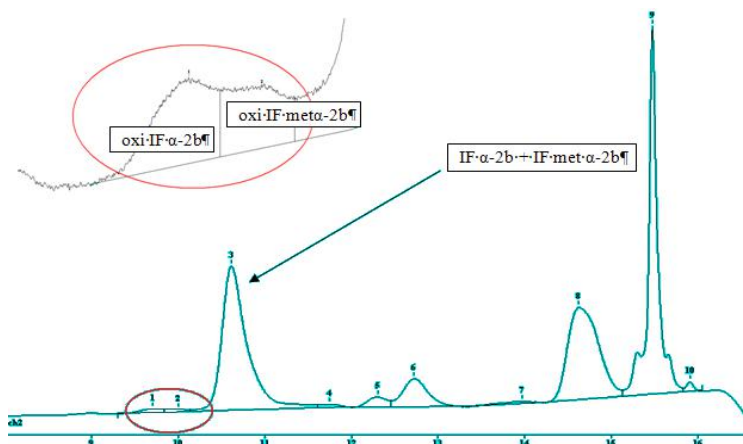


Рис. 1. Типичная хроматограмма (ОФ-ВЭЖХ) рекомбинантного IFN α -2b

Снижение аэрации за счет увеличения ф. загр. до 0,250 привело к увеличению содержания IFN met α -2b. Культивирование на «бедной» питательной среде (M9+ вместо $1,5LB+M9^+$) существенно снижало выход IFN α -2b в целом, причем доля IFN met α -2b не уменьшалась. Внесение добавки из 11 микроэлементов (ионы двухвалентных металлов) не повлияло на содержание IFN met α -2b. Повышение температуры культивирования с 37 до 42 °C привело к значительному снижению общего выхода IFN α -2b. Понижение температуры культивирования с 37 до 30 °C способствовало резкому снижению содержания IFN met α -2b, общий выход IFN α -2b не снижался по сравнению с контролем. Аналогичные изменения происходили при понижении температуры до 28 °C после внесения индуктора.

В ходе экспериментов было выдвинуто предположение, что в процессе образования ТВ эндогенные ферменты клетки не успевают удалять с N-конца формилированный метионин. В связи с этим была проведена работа по оптимизации условий культивирования для получения целевого белка в растворимом виде. Известно, что одним из способов получения белка в растворимом виде является снижение температуры культивирования [5]. Понижение температуры с 37 °C до 25 °C сразу после внесения индуктора, как при культивировании в колбах, так и при культивировании в ферментере привело к накоплению целевого белка в растворимой форме. На хроматограмме (рис. 2) видно, что полученный интерферон альфа-2b содержит одну окисленную форму, предположительно без N-концевого метионина.

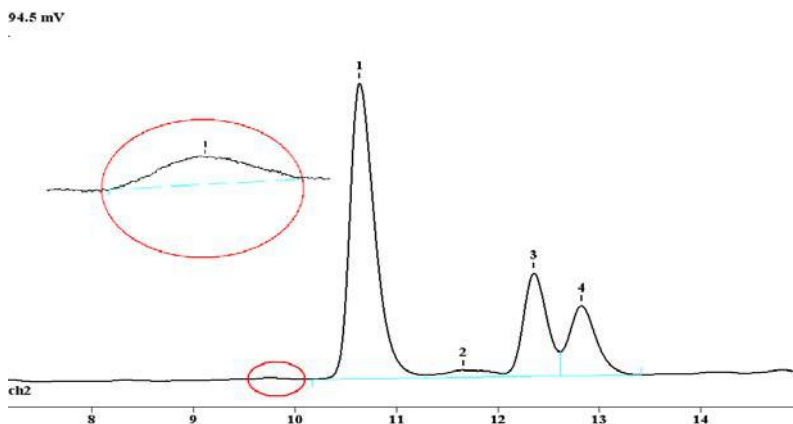


Рис. 2. Хромограмма (ОФ-ВЭЖХ) IFN α -2b в растворимом виде

Отсутствие N-концевого метионина было подтверждено MALDI масс-спектрометрией в линейном режиме (масс-спектрометр «ultrafleXtreme», Bruker, Германия). На рис. 3 представлен фрагмент MALDI масс-спектра полученного безметионинового интерферона α -2b и стандарта, рекомендованного ЕРh.

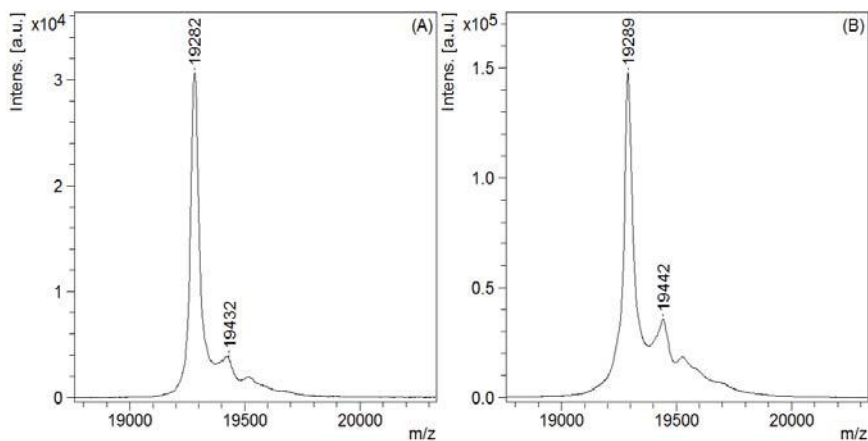


Рис. 3. Фрагмент MALDI масс-спектра IFN α -2b (А) и стандарта, рекомендованного ЕРh (В). Относительное содержание метиониновой формы интерферона ($m/z = 19440$) к безметиониновой ($m/z = 19280$) для IFN α -2b не превышает таковое в стандарте, рекомендованном ЕРh

Таким образом, в ходе данной работы были подобраны условия культивирования (снижение температуры до 25 °С на протяжении индукции), при которых накапливаемый интерферон α -2b соответствует стандарту, рекомендованному ЕРh.

Литература

1. Eur. Pharm., 5th ed.: 2004, Bodo G., Fogy I., 1985, The Interferon System, P. 23–27; Wetzel et al., 1981, J.Interfer. Res., 1:381–90.
2. Spector S., Flynn J.M., Tidor B., Baker T.A., Sauer R.T. Expression of N-formylated proteins in Escherichia coli. Protein Expression and Purification. 2003, N 32. P. 317–322.
3. Славченко И.Ю., Борейко Е.В., Воробей Н.В. Изучение влияния различных концентраций индуктора на выход альфа-2b интерферона человека в системе экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 в клетках Escherichia coli // Біополімери і клітина. 2003. 19, № 5. С. 457–462.
4. Широков Д.А., Рябиченко В.В., Акишина Р.И., Оспельникова Т.П., Глазунов А.В., Честухина Г.Г., Вейко В.П. Создание штаммов-продуцентов гибридных интерферонов альфа-2 человека и использование фермента энтеропептидазы для получения интерферонов без N-концевого остатка метионина. // Молекулярная биология. 2011. Т. 45. № 3. С. 466–471.
5. Zhang D., Wei P., Fan L. Lian J., Huang L., Cai J., Xu Z. High-level soluble expression of HIGF-1 fusion protein in recombinant Escherichia coli // Proc. Biochem. 2010. 45. P. 1401–1405.

ПРИНЦИП ЛЕЧЕНИЯ ПУТЁМ УСТРАНЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ДЕСИНХРОНОЗА

THE PRINCIPLE OF TREATMENT BY ELIMINATING PATHOLOGICAL DESYNCHRONOSIS

П.И. Бабич, В.Н. Зарубин

ООО «Сибирский инновационный центр», Россия

P.I. Babich, V.N. Zarubin

LLC «Siberian innovation center», Russia

e-mail: sicenter@bk.ru

Аннотация

В работе приведены результаты исследований в области хронофизиотерапии. На основе явления усвоения ритма живыми организмами разработан принцип лечения путём коррекции биоритмов организма и устранения патологического десинхроноза. Для реализации метода лечения разработан аппарат с функцией хронотерапии.

Abstract

The paper presents the results of research in the field of chronophysiotherapy. Based on the phenomenon of rhythm assimilation by living organisms developed the principle of treatment by correction of biorhythms of the body and eliminating pathological desyn-chronosis. To implement the method of the treatment apparatus with the function of chronotherapy developed.

Разработка относится к области хрономедицины и базируется на фундаментальном свойстве живой природы – принципе ритмичности биологических процессов [1]. Принцип раскрывает физико-химический механизм взаимодействия, лежащий в основе биологических процессов, протекающих на разных уровнях организации живой материи. Согласно этому принципу, все биологические процессы в организме протекают с разной скоростью и имеют свои биоритмы, которые изменяются в определённых диапазонах частот. Например, частота дыхания изменяется в диапазоне 0,2-0,4 Гц, пульса сердца 1-1,5 Гц, альфа-ритма мозга 8-12 Гц и т. д.

Взаимозависимость биологических процессов и их ритмов означает, что изменение одного из них автоматически сопровождается изменением другого. Поэтому, когда при заболевании в здоровой ткани происходит нарушение биологических процессов, то оно автоматически сопровождается отклонением их биоритмов от нормы – патологическим десинхронозом (ПД), т. е. возникает две взаимозависимые патологии: физиопатология и хронопатология. Следовательно, и устранять эти патологические процессы можно двумя способами: фармакотерапией и/или хронофизиотерапией. В настоящее время лечение этих патологий происходит следующим образом. В результате медикаментозной терапии в больной ткани происходит восстановление нарушенных биологических процессов, которое автоматически сопровождается нормализацией их биоритмов и тем самым устранением ПД. Однако такая терапия вызывает значительные побочные воздействия и не обеспечивает достаточную эффективность и безопасность лечения. С другой стороны, физиотерапевтический способ восстановления нарушенных биологических процессов путём коррекции их биоритмов и устранения ПД в медицинской практике не используется. Проблема здесь заключается в отсутствии методов и аппаратов хронофизиотерапии ПД. Об актуальности этой проблемы говорит тот факт, что для решения вопросов, связанных с десинхронозами, при РАМН создана проблемная комиссия «Хронобиология и хрономедицина».

Решение поставленной проблемы основано на использовании явления усвоения внешних ритмов живыми организмами, открытого академиком А.А. Ухтомским [2]. Оно характеризует способность тканей, органов и организма в целом перестраивать свои биоритмы под воздействием внешних ритмов (раздражений) и сохранять эти изменения после окончания воздействия. На этой основе разработан метод лечения различных заболеваний путём устранения ПД. В качестве источника внешних ритмов используется электромагнитное поле (ЭМП) частотой биоритмов здоровой ткани, в которой возник патологический процесс. Принцип лечения в этом случае заключается в следующем. Если на больную ткань подействовать ЭМП частотой биоритмов здоровой ткани, то, в результате усвоения ритма, биоритмы в больной ткани перестроятся на частоту биоритмов здоровой ткани, и произойдёт устранение ПД. В результате этого, согласно принципу ритмичности (взаимозависимости), автоматически произойдёт нормализация нарушенных биологических процессов, и наступит выздоровление больной ткани.

Использование частотной составляющей ЭМП из диапазона биоритмов здоровой ткани, в которой возникла патология, является необходимым и достаточным условием для возникновения явления усвоения ритма только в больной ткани. Таким образом, в результате прямого воздействия на больную ткань гарантируется получение только положительного терапевтического эффекта [3].

Метод лечения, реализующий принцип ресинхронизирующей терапии (лечение путём восстановления биоритмов в больной ткани), является альтернативой существующим методам фармакотерапии. Он открывает новое направление в области хрономедицины: лечение широкого спектра заболеваний, в т. ч. онкологических, путём устранения ПД. Это позволяет лечить болезни путём моно хронофизиотерапии без использования медицинских препаратов. На метод лечения получен патент РФ на изобретение [4].

Для внедрения метода в клиническую практику разработан аппаратно-программный комплекс с функцией хронотерапии ПД – хрономагнитокорректор (ХМК) биоритмов в организме [5]. ХМК охватывает лечением все ткани и органы, биоритмы которых попадают в диапазон его рабочих частот, и реализует две функции: хронотерапию и магнитотерапию. В функции хронотерапии в качестве физического фактора воздействия на больную ткань используется частота биоритмов здоровой ткани. В результате чего в больной ткани возникает явление усвоения ритма, запускается процесс восстановления биоритмов и происходит устранение патологических процессов. Функция магнитотерапии за счёт реологического эффекта оказывает дополнительное стимулирующее воздействие на больную ткань и ускоряет процесс выздоровления.

Таким образом, высокая эффективность лечения на ХМК достигается за счёт отсутствия побочных эффектов и комплексного воздействия на больную ткань 2-мя методами: хронотерапии ПД и обычной магнитотерапии. При этом положительная динамика лечения, в зависимости от вида заболевания, увеличивается на 15–20 %, а употребление лекарственных препаратов снижается до 50 %.

Литература

1. Загускин С.Л. Ритмы клетки и здоровье человека // Монография. Ростов-на-Дону, ЮФУ, 2010. 292 с.
2. Ухтомский А.А. Усвоение ритма в свете учения о парабии // Избранные труды. Под редакцией Е.М. Крепса. Ленинград: Издательство «Наука», 1978. Серия «Классики науки».
3. Зарубин В.Н. Устранение патологических процессов в организме путём ресинхронизации биоритмов. // III Международный форум «Общественное здоровье: организация, менеджмент, право – перспективы развития – мероприятия-спутника форума технологического развития «Технопром–2017»: Сб. материалов / под общей редакцией: И.О. Маринкина, М.А. Садового. Новосибирск: Издательско-полиграфический центр НГМУ, 2017. С. 68–71.
4. Зарубин В.Н. Способ терапевтического воздействия низкочастотным импульсным ЭМП. // Патент РФ на изобретение № 2616330.
5. Зарубин В.Н., Семин М.М. Магнитоимпульсный низкочастотный терапевтический аппарат. // Патент РФ на полезную модель № 120878.

МЕТАБОЛОМИКА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЫ И ДИАГНОСТИКИ *

METABOLOMICS AS A POWERFULL INSTRUMENT FOR FORENSIC MEDICINE AND DIAGNOSTICS

Е.А. Зеленцова^{1,2}, Л.В. Яньшолё^{1,2}, О.А. Снытникова^{1,2},
В.В. Яньшолё^{1,2}, Ю.П. Центалович¹

¹*Международный томографический центр СО РАН, Новосибирск, Россия*

²*Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

E.A. Zelentsova^{1,2}, L.V. Yanshole^{1,2}, O.A. Snytnikova^{1,2},
V.V. Yanshole^{1,2}, Yu.P. Tsentalovich^{1,2}

¹*International Tomography Center of the SB RAS, Novosibirsk, Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

e-mail: zelentsova@tomo.nsc.ru

Аннотация

Метаболомный анализ посмертных изменений биологических жидкостей и тканей дает возможность разработки новых методов оценки времени смерти индивида. Результаты такого метаболомного анализа можно также использовать для исследования метаболомных изменений, развивающихся в ходе различных заболеваний, когда образцы тканей после операций от живых доноров сравниваются с посмертными образцами.

Abstract

The analysis of post-mortem metabolomic changes in biological fluids and tissue opens the way to develop new methods for the estimation of post-mortem interval. It may also help in the analysis of disease-induced metabolomic changes in human tissues when the postoperational samples are compared to the post-mortem samples.

Очень часто перед криминалистами и судмедэкспертами встает вопрос об установлении времени наступления смерти человека. Как в нашей стране, так и в мире в практике применяются устаревшие по своим возможностям методы: измерение температуры тела, анализ трупных пятен и окоченелости и некоторые другие методы для специфичных случаев. Однако все перечисленные методики дают очень неточные результаты и неравномерно покрывают временную

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-33-00669).

шкалу: одни методы подходят только для первых часов после смерти, другие дают ответ о количестве дней. Поэтому одной из целей данного исследования является разработка нового метода определения давности наступления смерти, основанного на метаболомном профилировании биологических жидкостей.

Метаболомное профилирование является очень перспективным методом для ранней диагностики заболеваний, поскольку позволяет обнаружить связанные с развитием патологии изменения в метаболоме до проявления клинических признаков. Для исследования огромного числа заболеваний в качестве контрольной группы (здоровые пациенты) зачастую выступают посмертные доноры в виду сложности получения тканей от живых здоровых пациентов. Ярким примером является исследование катаракты: катарактальные хрусталики доступны для исследователя благодаря операциям по замене их на синтетические аналоги, в то время как получение здоровых хрусталиков от живых пациентов невозможно. Поэтому вторым значимым применением нашего исследования является возможность разделения патологических и посмертных изменений в метаболомном составе для корректного сравнения метаболомных профилей тканей от живых и мертвых доноров, и установление достоверных интервалов для конкретных тканей и метаболитов.

В ходе данной работы были проведены поиск потенциальных метаболомных маркеров времени смерти и классификация изменений метаболомного состава крови, водянистой влаги и стекловидного тела кролика после его смерти в зависимости от времени.

Количественное метаболомное профилирование плазмы крови, водянистой влаги и стекловидного тела, полученных в разное время после смерти кролика, было проведено с использованием высокочастотной ЯМР-спектроскопии в сочетании с ВЭЖХ-МС высокого разрешения – двух самых передовых методов метаболомики. В ходе выполнения работы в плазме крови, водянистой влаге и стекловидном теле кролика количественно был определен 61 метаболит. Было установлено, что посмертные метаболомные изменения водянистой влаги и стекловидного тела протекают медленнее, чем происходят изменения в крови; при этом разброс данных для образцов водянистой влаги и стекловидного тела ниже, чем для крови. Среди метаболитов, концентрация которых увеличивается со временем после смерти, наиболее значительный и линейный рост концентрации наблюдается для гипоксантина, холина и глицерина.

Установлено, что для поиска маркеров времени смерти водянистая влага и стекловидное тело являются более подходящими биологическими жидкостями, чем плазма крови. В качестве потенциальных маркеров оценки времени смерти могут быть использованы такие низкомолекулярные соединения, как гипоксантин, холин и глицерин. Данная работа является подготовительным этапом перед исследованием посмертных изменений метаболомного состава биологических жидкостей человека.

**УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ THERMODESULFOVIBRIO V2
И DESULFOTOMACULUM BU1-1
К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ НИКЕЛЯ**

NICKEL RESISTANCE IN *THERMODESULFOVIBRIO* STRAIN V2
AND *DESULFOTOMACULUM* STRAIN BU1-1

К.М. Климова

*Национальный исследовательский Томский государственный
университет, Томск, Россия*

K.M. Klimova

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

e-mail: ksenia.m.klimova@gmail.com

Аннотация

Термофильные сульфатредуцирующие бактерии, обозначенные как штаммы V2 и Bu1-1, были выделены из воды скважин 5-Р (пос. Чажемто, Томская обл.) и 1-Р (п. Белый Яр, Томская обл.), соответственно. Оба вида сульфидогенных бактерий показали результаты в очень узком диапазоне колебаний. В целом, биопреципитация и восстановление сульфата были выражены при более низких концентрациях (до 200 мг/л) и были ингибированы при более высоких концентрациях (1000 мг/л).

Abstract

A thermophilic sulfate-reducing bacterium, designated as strains V2 and Bu1-1, was isolated from water of 5-P well (Chazhemto village, Tomsk Obl.) and 1-P (Belyy Yar settlement, Tomsk Obl.), respectively. Both sulphidogenic bacterial species showed results in a very narrow range of fluctuations. In general, bioprecipitation and sulphate reduction were pronounced at lower concentrations (200 mg/l) and got inhibited at higher concentrations (1000 mg/l).

Большое количество различных антропогенных видов деятельности, особенно связанных с горными и другими промышленными процессами, постоянно вносят тяжелые металлы в окружающую среду. Широко известны пря-

мые и косвенные вредные воздействия ионов металлов на природу и здоровье человека [1, 2]. Поэтому обработка данного вида загрязнения необходима прежде чем выгружать их в окружающую среду. Наиболее широко используемым методом удаления ионов металлов является химическая нейтрализация – дорогостоящий метод, при котором вероятно образование вторичных загрязняющих веществ. Альтернативой этому является биологическая очистка сточных вод, загрязненных тяжелыми металлами. Основными преимуществами биологических методов являются их более высокая производительность, низкие эксплуатационные расходы, минимальная генерация вторичных загрязняющих веществ и экологически совместимая природа. В последнее десятилетие использование сульфатовосстанавливающих бактерий в целях биоремедиации в водоемах и сточных водах фабрик, загрязненных металлом, приобрело значение среди всех биологических методов, используемых для удаления токсичных ионов [3,4].

Загрязнение никелем чаще всего локальное: образуются биогеохимические «провинции» с повышенным его содержанием в почве, воде, воздухе и местных продуктах питания растительного и животного происхождения. В воду никель может попадать в результате выветривания из коренных пород и вымывания из почвы. Значительные количества никеля поступают в водоемы со сточными водами промышленных предприятий [5].

Целью нашего исследования является определение устойчивости к металлам для двух штаммов термофильных сульфатредуцирующих бактерий, выделенных из глубинных водоносных горизонтов в Томской области. Штамм V2 принадлежит к роду *Thermodesulfovibrio* (Nitrospirae), в то время как штамм Bu1-1 относится к роду *Desulfotomaculum* (Firmicutes).

Для определения резистентности к ионам никеля (Ni^{2+}), штаммы V2 и Bu1-1 культивировали на жидкой среде Видделя при нейтральном pH (от 7,0 до 7,5) в термостатах на 65 °C и 50 °C, соответственно. К среде добавляли водный раствор NiSO_4 , в каждом пассаже увеличивая концентрацию металла. В качестве донора электронов использовали лактат ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$), в качестве акцептора сульфат (Na_2SO_4). Помимо этого, в среду при посеве добавлялась железная скрепка как дополнительный источник железа, а также для поддержания восстановленных условий.

Оба штамма сульфатредуцирующих бактерий V2 и Bu1-1 устойчивы к высоким концентрациям никеля (рис. 1). Штамм Bu1-1 более устойчив к высокому содержанию никеля в среде, чем штамм V2. Возможно, более высокая резистентность штамма связана с тем, что род *Desulfotomaculum* относится к спорообразующим бактериям.

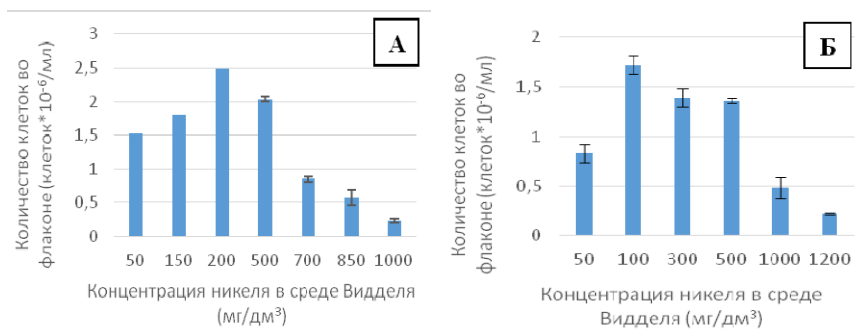


Рис. 1. Динамика роста штамма V2 (А) и Bul-1 (Б) при повышении концентрации ионов Ni^{2+} в среде Видделя

Представители сульфатредуцирующих бактерий обладают способностью к восстановлению хорошо растворимых в воде токсичных солей тяжелых металлов и металлоидов до плохо растворимых и менее токсичных соединений при помощи металл-редуктаз. Так как в последнее время загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами и металлоидами в результате антропогенного воздействия значительно возросли, то способность штаммов *Thermodesulfovibrio* V2 и *Desulfotomaculum* Bul-1 выдерживать высокие концентрации никеля дает возможность использовать данные штаммы микроорганизмов в целях биоремедиации.

Литература

1. Goyer R.A., Clarkson T.W. Toxic effects of metals // Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 2001. P. 811–867.
2. Si W., Liu J., Cai L., Jiang H., Zheng C., He X., Wang J., Zhang X. Health risks of metals in contaminated farmland soils and spring wheat irrigated with Yellow River water in Baotou, China // Bull Environ Contam Toxicol. 2015. Vol. 94(2). P. 214–219.
3. Neculita C.M., Zagury G.J., Bussi re B. Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs // Environ Qual. 2007. Vol. 36(1). P. 1–16.
4. Martins M., Faleiro M.L., Barros R.J., Verissimo A.R., Barreiros M.A., Costa M.C. J Hazard Mater // Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. 2009. Vol. 166 (2–3). P. 706–13.
5. Muyzer G., Stams M. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria // Nature Reviews Microbiology. 2008. Vol. 6. P. 441–454.

ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ФАГОВЫХ ПЕПТИДНЫХ БИБЛИОТЕК ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

PREPARATION OF SPECIMENS OF PHAGE PEPTIDE LIBRARIES FOR A NEXT GENERATION SEQUENCING

Е.А. Колосова¹, И.В. Морозов², Д.Н. Щербakov¹

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

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

E.A. Kolosova¹, I.V. Morozov², D.N. Shcherbakov¹

¹ *SRC VB «Vector», Russia*

² *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Russia*

e-mail: kurchanovaea@gmail.com

Аннотация

Секвенирование нового поколения предъявляет особые требования к качествуготавливаемых образцов. В статье описан протокол подготовки фаговых пептидных библиотек для NGS секвенирования на платформе Ion Proton System. Описаны условия проведения ПЦР без стадии выделения ДНК бактериофага М13. Подобраны титр бактериофагов, концентрация и температура отжига индекс праймеров и количество циклов для максимальной чувствительности и специфичности ПЦР.

Abstract

Next generation sequencing makes special demands on the quality of the samples being prepared. The article describes the protocol for the preparation of phage peptide libraries for NGS sequencing on the Ion Proton System platform. The conditions of PCR without the stage of isolation of bacteriophage M13 DNA are described. The bacteriophage titer was selected, the concentration and annealing temperature of the primer index and the number of cycles for maximum sensitivity and specificity of PCR.

Особенностью NGS секвенирования по сравнению с секвенированием по Сенгеру, является большое влияние этапа пробоподготовки на конечный результат. Традиционно пробоподготовка включает в себя несколько стадий: вы-

деление ДНК из образцов, амплификация необходимых для исследования участков последовательности, и последующее баркодирование полученных ампликонов индекс праймерами. Кропотливый подбор условия каждой стадии пробоподготовки позволяет получить корректных результаты и наоборот пренебрежение этапом пробоподготовки может оставить исследователя без результата.

Таким образом, целью работы являлась оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцов фаговых пептидных библиотек для последующего секвенирования на платформе Ion Proton System.

Для оптимизации параметров проведения ПЦР были использованы 8 фаговых пептидных библиотек, экспонирующих в составе главного поверхностного белка рVIII, чужеродные пептиды длиной 6, 8, 10, 12 аминокислот, а также пептиды кольцевой структуры с6с, с8с, с10с, с12с. Кольцевая структура достигается включением в состав пептида фланкирующих остатков цистеина. Биологическая концентрация каждого образца определялась методом Грация и составила 10^{13} БОЕ/мл. В связи с низким биологическим титром образцов, использование различных наборов и протоколов для выделения ДНК приводило к либо ингибированию последующей ПЦР, либо к потере ДНК, поэтому для проведения реакции в качестве матрицы были использованы непосредственно фаговые частицы, разведенных до концентрации 10^6 БОЕ/мл. ПЦР проводился с использованием готовой смеси qPCRmix-HS LowROX (Евроген, Москва, Россия). Анализ ПЦР проводили при помощи электрофоретического разделения продуктов ПЦР в агарозном геле.

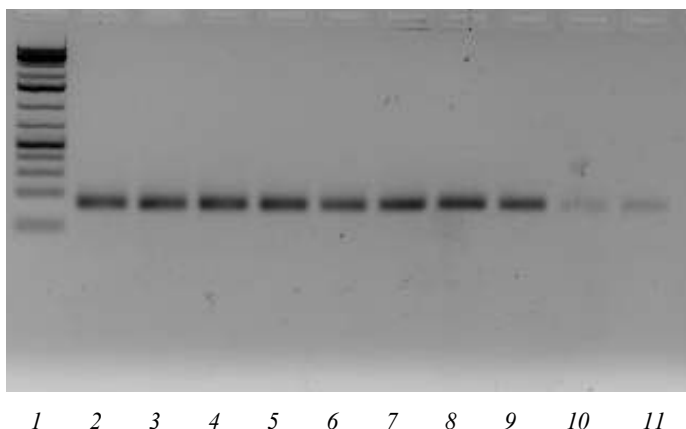


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР 6-мерной фаговой пептидной библиотеки, выполненной в градиенте температур. 1 – маркер 1 kb, 2, 3 – температура отжига 52 °C; 4, 5 – температура отжига 56 °C; 6, 7 – температура отжига 60 °C; 8, 9 – температура отжига 64 °C; 10, 11 – температура отжига 68 °C

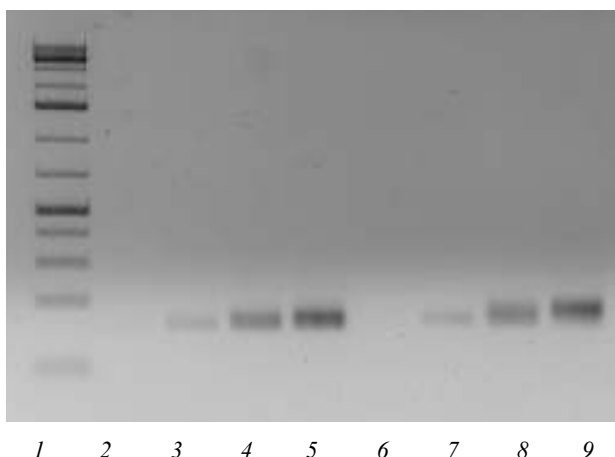


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР 6- и 10-мерной фаговой пептидной библиотеки с разным числом циклов. 1 – маркер 1 kb, 2, 6 – 12 ц.; 3, 7 – 16 ц.; 4, 8 – 20 ц.; 5, 9 – 24 ц, 6- и 10-мерные фаговые пептидные библиотеки соответственно

Были определены участки для секвенирования и подобраны индекс-праймеры для баркодирования ампликонов. Для амплификации и баркодирования участков ДНК использованы последовательности индекс праймеров из набора Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-96 Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Индекс-праймеры синтезировались ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва, Россия).

В связи с тем, что на процесс амплификации продуктов реакции влияет образование димеров праймеров, был произведен подбор концентраций праймеров, которая составила 1 пМ/мкл. Для определения температуры отжига проводилось ПЦР с градиентом температур 52–64°C.

На основании данных, полученных и представленных на рис. 1, можно сделать вывод, что амплификация при температуре 60°C позволила получить максимальное количество специфического ПЦР продукта.

Для определения оптимального количества циклов ПЦР необходимых для синтеза достаточно количества продукта использовался диапазон циклов от 1 до 36 циклов.

Наилучший результат был, достигнут при использовании 18 циклов ПЦР.

Таким образом, в результате исследования был оптимизирован протокол подготовки фаговых пептидных библиотек для NGS секвенирования на платформе Ion Proton System. Подобраны условия проведения ПЦР без стадии выделения ДНК бактериофага M13. Рекомендованы титр бактериофагов, концентрация и температура отжига индекс праймеров и количество циклов для максимальной чувствительности и специфичности ПЦР.

**РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК –
ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 В КАЧЕСТВЕ
ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ**

DEVELOPMENT OF INHIBITORS OF DNA REPAIR ENZYME –
TYROSYL-DNA-PHOSPHODIESTERASE 1 AS A PROTOTYPES
OF MEDICAL DRUGS FOR ANTI-CANCER THERAPY

А.О. Комарова

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

A.O. Komarova

*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
Novosibirsk, Russia*

e-mail: a.komarova8@g.nsu.ru

Аннотация

В данной работе были выявлены эффективные ингибиторы фермента репарации ДНК – тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1), играющего важную роль в резистентности раковых клеток к применяющимся в настоящее время противоопухолевым препаратам на основе камптотецина и его аналогов. Выявленные ингибиторы принадлежат к группе дисахаридных нуклеозидов и производных азотистых оснований, для них определены параметры IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) и кинетические параметры ферментативной реакции на олигонуклеотидных ДНК-субстратах с различными типами повреждений. Исследована способность соединений-лидеров ингибировать активность природного мутанта Tdp1, вызывающего у человека нейродегенеративное заболевание – синдром спиноцереbellлярной атаксии и нейропатии (SCAN1). В работе также была определена собственная цитотоксичность ингибиторов-лидеров и их влияние на цитотоксичность противоракового препарата топотекана с помощью стандартного МТТ-теста на линии клеток HeLa и HEK293.

Abstract

In this work, effective inhibitors of the DNA repair enzyme tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 (Tdp1), which plays an essential role in the resistance of cancer cells to currently used antitumor drugs based on camptothecin and its analogues, were identified. The discovered inhibitors belong to the group of disaccharide nucleosides and derivatives of nitrogenous bases; the IC_{50} parameters (half-maximal inhibitory concentration) and the kinetic parameters of the enzymatic reaction were calculated for leading compounds using different types of DNA oligonucleotides. Moreover, these compounds were tested as inhibitors of Tdp1 mutant form, which causes a human neurodegenerative disease – spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy (SCAN1). In our work we also determined the cytotoxicity of the most effective inhibitors and their effect on the cytotoxicity of anticancer drug topotecan using a standard MTT test on the HeLa and HEK293 cell lines.

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности людей в мире. Перспективной мишенью для лечения онкологических заболеваний является фермент тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1), основная функция которого – удаление повреждений с 3'-конца ДНК, которые возникают *in vivo* под действием различных эндогенных и экзогенных факторов, в том числе при проведении химиотерапии [1].

В настоящее время для лечения рецидивирующих и персистирующих опухолей (в частности, при раке толстой кишки, шейки матки, яичников, легких) в клинической практике широко применяются препараты-ингибиторы другого фермента – топоизомеразы 1 (Top1) на основе природного противоопухолевого соединения камптотецина, например, топотекан и иринотекан [2]. Данные препараты, блокируя Top1, вызывают накопление в клетке ковалентных комплексов Top1 с 3'-концом ДНК, что в случае столкновения такого аддукта с репликативной вилкой может приводить к гибели клетки. В свою очередь, Tdp1 удаляет Top1 с 3'-конца ДНК, препятствуя действию ингибиторов Top1 и снижая тем самым эффективность противораковых препаратов. Поэтому ингибирование фермента Tdp1 способно селективно усилить терапевтический эффект производных камптотецина при лечении некоторых видов рака, а сочетание препаратов, воздействующих и на Top1, и на Tdp1, может существенно повысить эффективность химиотерапии [3, 4]. При этом важно, чтобы применение ингибитора не приводило к дополнительной токсической нагрузке на организм.

В данной работе был осуществлен скрининг широкого ряда синтетических аналогов природных соединений на основе производных дисахаридных нуклеозидов и азотистых оснований с целью подавления активности Tdp1. Эти классы природных соединений являются достаточно перспективными, т. к. они проявляют широкий спектр биологической активности и способны достаточно легко проникать в клетку с помощью нуклеозидных транспортеров, проявляя при этом низкую цитотоксичность [5, 6]. В ходе скрининга были выявлены ингибирующие соединения-лидеры, для которых определены параметры IC_{50} на двух типах флуоресцентных олигонуклеотидных ДНК-субстратов, разработанных в нашей лаборатории [7]. Среди них обнаружены ингибиторы Tdp1 со значениями IC_{50} , лежащими в низком микромолярном диапазоне, что соответствует результатам мирового уровня.

Для более детального изучения взаимодействия исследуемых ингибиторов с ферментом нами были получены кинетические параметры ферментативной реакции в присутствии ингибиторов-лидеров на двух типах олигонуклеотидных ДНК-субстратов и определен тип ингибирования. Показано, что данные соединения не являются конкурентными ингибиторами.

Исследована способность соединений-лидеров ингибировать природную мутантную форму Tdp1, в которой один из каталитических остатков гистидина заменен на аргинин (H493R), что приводит к развитию тяжелого нейродегенеративного заболевания – синдрома спиноцеребеллярной атаксии и нейропатии (SCAN1).

Для оценки цитотоксичности исследуемых ингибиторов был проведен ряд экспериментов на опухолевых клетках линии HeLa и человеческих эмбриональных клетках почек HEK293 с помощью МТТ-теста. Продемонстрирована низкая собственная цитотоксичность разработанных ингибиторов, а также усиление цитотоксического эффекта топотекана на опухолевых клетках в присутствии некоторых из них, что имеет большое значение для дальнейшего применения их в комбинации с противораковыми препаратами.

Таким образом, исследуемые соединения являются перспективными для дальнейшей разработки на их основе сенситизаторов опухолей к известным противоопухолевым препаратам. Терапевтическим эффектом таких веществ может быть селективное увеличение активности ингибиторов Top1 в опухолях с нарушениями в процессах репарации ДНК и контроля клеточного цикла.

Литература

1. Yang S.W., Burgin A.B., Jr., Huizenga B.N., Robertson C.A., Yao K.C., Nash H.A. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. Vol. 93. № 21. P. 11534–11539.
2. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond // *Nature Reviews Cancer*. 2006. Vol. 6. № 10. P. 789–802.
3. Barthelmes H.U., Habermeyer M., Christensen M.O., Mielke C., Interthal H., Pouliot J.J., Boege F., Marko D. TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 53. P. 55618–5525.
4. El-Khamisy S.F., Katyal S., Patel P., Ju L., McKinnon P.J., Caldecott K.W. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin // *DNA Repair*. 2009. Vol. 8. I. 6. P. 760–766.
5. Ефимцева Е.В., Куликова И.В., Михайлов С.Н. Дисахаридные нуклеозиды— важная группа природных соединений // *Молекулярная биология*. 2009. Т. 43. № 2. С. 327–338.
6. King A.E. et al. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets // *Trends in pharmacological sciences*. 2006. Vol. 27. I. 8. P. 416–425.
7. Lebedeva N.A. et al. Design of a new fluorescent oligonucleotide-based assay for a highly specific real-time detection of apurinic/apyrimidinic site cleavage by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // *Bioconjugate chemistry*. 2015. Vol. 26. № 10. P. 2046–2053.

**СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ОЛИГОСАХАРИДОВ И ЛИПИДОВ, ПРОЧНО СВЯЗАННЫХ
С ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ МОЛОКА ЧЕЛОВЕКА***

**THE STRUCTURE AND BIOLOGICAL PROPERTIES
OF OLIGOSACCHARIDES AND LIPIDS STRONGLY ASSOCIATED
WITH HUMAN MILK IMMUNOGLOBULINS**

И.Ю. Компанеец, Г.А. Невинский

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

I.Y. Kompaneets, G.A. Nevinsky

SB RAS ICBFM, Russia

e-mail: kompaneecivan@mail.ru

Аннотация

Известно, что иммуноглобулины молока прочно нековалентно связаны с олигосахаридами и липидами пока неустановленной структуры. В работе определены мол. массы связанных с антителами молока олигосахаридов и липидов, а также проанализированы их биологические свойства.

Abstract

It is known that milk immunoglobulins are strongly non-covalently bound to oligosaccharides and lipids until an unidentified structure. The molecular masses of oligosaccharides and lipids were determined and their biological properties were analyzed.

В первые месяцы жизни новорожденных их иммунная система сформирована не полностью. У них практически отсутствуют защитные свойства слизистых оболочек, вследствие чего защита желудочно-кишечного

* Работа поддержана грантом Подпрограммы 1 комплексной программы Сибирского отделения РАН (III.2П.1/VI.57-5, 0309-2015-0022).

тракта от бактериальных и вирусных инфекций осуществляется иммуноглобулинами молока матери. Ранее показано, что антитела молока прочно нековалентно связаны с олигосахаридами и липидами, что является одним из факторов, определяющих их биологическую активность. Гликозилирование является важной посттрансляционной модификацией белков, и от особенностей гликозилирования существенно зависят их биологические функции. В связи с этим, особенности структуры таких олигосахаридов и липидов представляют особый интерес.

Экстракцию нековалентно прочно связанных с антителами олигосахаридов и липидов осуществляли смесью хлороформ: метанол. Масс-спектрометрический анализ выделенных таким образом олигосахаридов и липидов выявил наличие соединений с мол. массами 1200–8600 Да. В литературе нет данных по олигосахаридам и липидам молока с подобными мол. массами. Биохимическим анализом показано, что обнаруженные липиды и олигосахариды не содержат в своем составе пептиды, аминокислоты и сложные эфиры.

Антитела молока наряду с каноническими функциями обладают также каталитическими свойствами. Анализ ферментативной активности антител до и после удаления углеводного компонента выявил существенное снижение ДНКазной активности. В тоже время удаление олигосахаридов и липидов не повлияло на амилолитическую и протеолитическую активности антител молока.

Детальное исследование структуры и биологических свойств компонентов каталитически активных антител необходимо для создания искусственных антител-ферментов с новыми свойствами.

**ПОВЕДЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ПОКРЫТИЕМ
ИЗ МЕЗОПОРИСТОГО ОКСИДА КРЕМНИЯ
В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ И ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ
С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ MDA-MB-231**

**BEHAVIOR OF GOLD NANOPARTICLES WITH MESOPOROUS SILICA
SHELL IN CELL CULTURE MEDIUM AND THEIR INTERACTION
WITH MDA-MB-231 CELL LINE**

К.В. Корчагина¹, Р.Г. Пархоменко², Е.И. Рябчикова¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН,
Новосибирск, Россия*

K.V. Korchagina¹, R.G. Parkhomenko², E.I. Ryabchikova¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia*

e-mail: ksenkor1985@yandex.ru

Аннотация

Мезопористый оксид кремния ($mSiO_2$) – перспективный наноматериал для создания терапевтических наноконструкций. В данной работе исследовали поведение наночастиц золота, покрытых $mSiO_2$ и их взаимодействие с клетками линии MDA-MB-231. Показали, что слой $mSiO_2$ постепенно разрушается в культуральной среде и в клетки проникают частицы, как с целой, так и с повреждённой мезопористой оболочкой. Исследуемые частицы накапливаются в структурах эндосомально-лизосомальной системы и не оказывают на клетки видимого повреждающего действия.

Abstract

Mesoporous silica ($mSiO_2$) is a promising nanomaterial for the development of therapeutic nanoconstructions. The behavior of gold nanoparticles coated with $mSiO_2$ and their interaction with MDA-MB-231 cells were examined. It was shown that the $mSiO_2$ layer was gradually destroyed in the culture medium and the particles penetrated

into the cells, both with the whole and with the damaged mesoporous shell. The investigated particles were accumulated in the structures of the endosomal-lysosomal system and did not exert visible damage on the cells.

Введение

Пористые наноматериалы используют при создании наноконструкций (НК) для адресной доставки терапевтических или диагностических молекул. Пористость позволяет защитить эффекторные молекулы от агрессивной внутренней среды организма, а также увеличить площадь поверхности для их связывания. Одним из перспективных пористых наноматериалов для биотехнологии является мезопористый оксид кремния ($mSiO_2$), отличающийся биологической инертностью и способностью разрушаться в организме с формированием нетоксичных продуктов. Создание НК для доставки эффекторных молекул с использованием $mSiO_2$ предполагает изучение их целевых свойств на клетках *in vitro*, прежде, чем переходить к экспериментам *in vivo*.

Цель данной работы: изучить поведение наночастиц золота, покрытых $mSiO_2$ в культуральной среде (без сыворотки, с сывороткой крупного рогатого скота (КРС), кондиционированной) и их взаимодействие с клетками линии MDA-MB-231.

Материалы и методы

Исследовали два варианта НК:

- (1) сферические $65,1 \pm 2,2$ нм в диаметре, кор – сферическая наночастица золота диаметром $10,8 \pm 1,0$ нм, покрыт $mSiO_2$ (**AuNP@mSiO₂**);
- (2) палочковидные, $59,7 \pm 7,5/49,7 \pm 3,6$ нм в диаметре, кор – наностержни золота длиной $31,8 \pm 5,3$ нм и диаметром $10,4 \pm 2,0$ нм, покрыт $mSiO_2$ (**AuNR@mSiO₂**).

Изучение стабильности НК в биологических жидкостях

Структуру НК исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии (ЭМ). Для этого НК инкубировали в течение 4, 8, 24 ч (1) со средой IMDM, (2) со средой IMDM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки КРС, (3) с кондиционированной средой IMDM. Полученные суспензии НК сорбировали в течение 1 мин на медные сетки с формваровой подложкой, укрепленной углеродом, затем контрастировали водными растворами уранилacetата (0,5 %) или фосфорновольфрамовой кислоты (2 %) в течение 30 с. Полученные препараты изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (JEOL, Япония), оснащенном цифровой камерой бокового ввода Veleta (Olympus Soft Imaging Solution, Германия).

Изучение взаимодействия НК с клетками линии MDA-MB-231

Клетки MDA-MB-231 культивировали в среде IMDM с 10 % эмбриональной сыворотки КРС. Затем добавляли к клеткам НК AuNR@SiO₂ в концентрации 10⁸/мл, и инкубировали в течение 15, 30 мин, 1, 4, и 24 ч. Затем клетки снимали с чашки с помощью трипсина, отмывали PBS, 5 мин центрифугировали при 5 000 g, осадок фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида.

Образцы дофиксировали 1 %-ым раствором четырехоксида осмия, обезвоживали в серии спиртов восходящей концентрации и ацетоне, заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме EM UC7 (Leica, Германия), контрастировали растворами уранилацетата и цитрата свинца и изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (JEOL, Япония).

Результаты и их обсуждение

И сферические, и палочковидные НК имеют отчетливую пористую структуру слоя, покрывающего электронно-плотный золотой кор. Инкубация НК в различных вариантах культуральной среды приводит к разрушению мезопористой оболочки. Дегградация mSiO₂ не зависит от формы кора НК и происходит постепенно. Мезопористый слой сохраняет целостность в течение, как минимум, 4 ч. Этого времени достаточно для интернализации НК клетками, что позволяет использовать их для исследований *in vitro*.

Через 8 ч инкубации НК имеют изрезанные контуры, слой мезопористого оксида кремния истончается, что приводит к уменьшению размеров НК. После 24 ч инкубации НК в культуральной среде без сыворотки мезопористый слой разрушается полностью (рис. 1), тогда как в культуральной среде с добавлением сыворотки КРС вокруг НК сохраняются остатки mSiO₂. Таким образом, можно заключить, что в присутствии сыворотки КРС оболочка из mSiO₂ разрушается медленнее, чем в культуральной среде без нее.

В данной работе изучали взаимодействие НК со стержневидным кором (AuNR@SiO₂) с клетками линии MDA-MB-231. Сорбция НК AuNR@SiO₂ на поверхности клеток наблюдается на протяжении всего периода инкубации. Скопления частиц отмечаются в глубоких инвагинациях плазмалеммы с многочисленными кавеолами и «опушенными» ямками, это позволяет заключить, что AuNR@SiO₂ проникают в клетки преимущественно микрэндоцитозом.

В цитоплазме клеток НК AuNR@SiO₂ локализуются в структурах эндосомально-лизосомальной системы (мультивезикулярных тельцах и лизо-

сомах) и на протяжении всего периода инкубации не выходят за пределы этого компартмента.

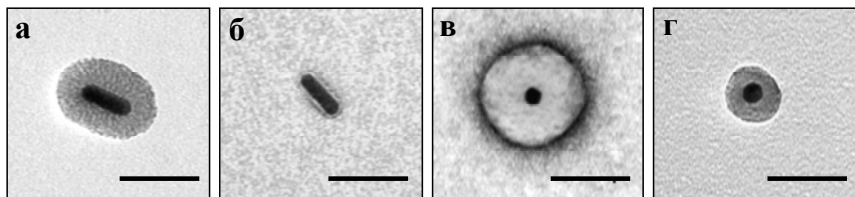


Рис. 1. Разрушение слоя мезопористого оксида кремния НК AuNR@mSiO₂ (а, б) и НК AuNP@mSiO₂ (в, г) в культуральной среде. а, в – НК в дистиллированной воде (контроль); б, г – НК через 24 ч инкубации в культуральной среде. Просвечивающая электронная микроскопия, контрастирование уранилацетатом. Длина масштабной линии 50 нм.

Через 24 ч инкубации во внеклеточном пространстве регистрируются НК AuNR@mSiO₂ с практически полностью разрушенным слоем mSiO₂, тогда как в мультивезикулярных тельцах и лизосомах отмечаются частицы с разной степенью повреждения мезопористой оболочки. При инкубации в подкисленной культуральной среде (pH 4,5), моделирующей кислую среду эндосомально-лизосомального компартмента клеток, мезопористый слой НК сохраняется в течение 24 ч. По-видимому, разная степень разрушения мезопористой оболочки НК, наблюдаемая в эндосомально-лизосомальных структурах, определяется временем нахождения НК вне клеток (в культуральной среде).

Сферические НК AuNP@mSiO₂ взаимодействуют с клетками аналогично (Ryabchikova E.I. et al., 2017). Таким образом, форма наночастицы золота (кора НК) не влияет на способ проникновения и локализацию исследуемых НК в клетках.

В результате данной работы мы показали, что НК AuNR@mSiO₂ проникают в клетки и не оказывают на них видимого повреждающего действия. Однако, слой mSiO₂ исследуемых НК постепенно разрушается в культуральной среде и в клетки проникают НК как с целой, так и с повреждённой мезопористой оболочкой. Таким образом, для применения НК AuNR@mSiO₂ в качестве доставщиков терапевтических и диагностических молекул необходимо разработать способ защиты слоя мезопористого оксида кремния.

**ОПЫТ ПО ВВЕДЕНИЮ В КУЛЬТУРУ IN VITRO
CORYLUS AVELLANA (L.) H. KARST.
ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ**

EXPERIENCE OF INTRODUCTION IN CULTURE IN VITRO
CORYLUS AVELLANA (L.) H. KARST.
FOR FURTHER MICROPROPAGATION

К.В. Малахова, Э.В. Марамохин

*ФГБОУ ВО «Костромской государственный университет»,
Кострома, Россия*

K.V. Malakhova, E.V. Maramokhin

FSEI «KSU», Russia

e-mail: malakhova.kv1@gmail.com

Аннотация

Corylus avellana (L.) H. Karst. является одним из ценнейших растительных ресурсов с точки зрения использования в пищевой промышленности, а также в фармакологии для получения таксола – вещества, обладающего противоопухолевой активностью. В соответствии с этим необходима оптимизация введения в культуру in vitro с целью повышения эффективности дальнейшего клонального микроразмножения.

Abstract

Corylus avellana (L.) H. Karst. is one of the most valuable plant resources from the point of view of use in the food industry and in pharmacology for obtaining Taxol substance having antitumor activity. In accordance with that necessary to optimize the introduction in culture in vitro with the aim of increasing the efficiency of further micropropagation.

Лещина обыкновенная (*C. avellana*) относится к числу хозяйственно ценных растительных объектов, поскольку ее сырье может быть исполь-

зовано в пищевой и фармакологической промышленности [2]. Так, одно из веществ (таксол), содержащееся в частях данного растения, обладает противоопухолевой активностью и может быть использовано при изготовлении препаратов. Растение обладает слабыми возможностями к традиционному вегетативному размножению, в связи с этим целесообразно для данной культуры прибегать к клональному микроразмножению для получения большого количества высококачественного посадочного оздоровленного материала [1].

В качестве донорных частей растения при введении *C. avellana* в культуру *in vitro* нами были использованы метамеры побега, которые обладали наибольшей морфогенной активностью, и вегетативные почки.

Для получения асептических эксплантов, а также стерилизации питательных сред использовались методы стерилизации согласно имеющимся рекомендациям. Предстерилизационный этап включал в себя промывание донорных частей растения в растворе перманганата калия (0,05 г/л) с экспозицией в 15 минут. Наиболее оптимальным режимом стерилизации оказался следующий: погружение донорных эксплантов в 70° этанол (1 минута), 3 % раствор гипохлорита натрия (20 минут). Оценка стерильности и жизнеспособности эксплантов проводилась на 5-е сутки и составляла: 87 % стерильных морфогенных эксплантов и 13 % нестерильных, пораженных эндогенной грибковой инфекцией.

При культивировании *C. avellana* использовалась питательная среда Driver-Kuniyuki Walnut (DKW), а также питательная среда Мурасиге-Скуга (MS), с добавлением 100 мг/л мезоинозита, 2 мг/л глицина, 0,5 мг/л тиамин, 0,5 мг/л пиридоксин, 20 мг/л компонентов углеводного питания (сахаров), 5,0 г/л агар [3]. С целью стимулирования ростовых процессов нами были использованы следующие регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (6-БАП), α -индолилуксусная кислота (ИУК) и гибберелловая кислота (ГК) в общепринятых концентрациях.

Результаты данного исследования показали, что использование данной модифицированной питательной среды DKW на этапе введения *C. avellana* в условия *in vitro* стимулировало активные ростовые процессы и вытягивание микропобега, что продемонстрировано на изображении (рис. 1).

Таким образом, нами был подобран наиболее оптимальный режим стерилизации донорных эксплантов, а также усовершенствован состав питательной среды при введении изучаемого растения в культуру



Рис. 1. *C. avellana* при введении в культуру in vitro:
14 сутки культивирования (слева) и 28 сутки культивирования (справа)

in vitro с целью дальнейшего массового клонального микроразмножения и получения оздоровительного высококачественного посадочного материала.

Литература

1. Алиханова А.А. Естественное вегетативное возобновление лещины обыкновенной и потенции к регенерации её изолированных структур: Автореферат диссертации кандидата биологических наук. Москва, 2009. 22 с.
2. Малахова К.В. Некоторые аспекты введения лещины обыкновенной (*Corylus avellana* (L.) H. KARST.) в культуру in vitro / К.В. Малахова, Д.Н. Зонтиков, Э.В. Марамохин // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 21-я Международная Пушкинская школа – конференция молодых ученых (Пушино, 17-21 апреля 2017 г.). Сборник тезисов. Пушино, 2017. С. 169.
3. Малахова К.В. Особенности состава питательной среды при введении лещины обыкновенной (*Corylus avellana* (L.) H. Karst.) в культуру in vitro / К.В. Малахова // Материалы 69 Межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Ступени роста». 2017. С. 134.

**SCHISANDRA CHINENSIS (TURCZ.) BAILL.
В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

**SCHISANDRA CHINENSIS (TURCZ.) BAILL.
IN CULTURE IN VITRO**

Э.В. Марамохин, К.В. Малахова

*ФГБОУ ВО «Костромской государственный университет»,
Кострома, Россия*

E.V. Maramokhin, K.V. Malakhova

FSEI «KSU», Russia

e-mail: maramokhin91@mail.ru

Аннотация

Schisandra chinensis (Turcz.) Baill. относится к трудноразмножаемым культурам как традиционным способом, так и в условиях in vitro. В настоящее время имеется много хозяйственно ценных сортов этого растения, используемых в пищевой и фармацевтической промышленности. Для удовлетворения возрастающего спроса на данную культуру необходимо оптимизировать технологию клонального микро-размножения как наиболее перспективную по сравнению с традиционным способом культивирования.

Abstract

Schisandra chinensis (Turcz.) Baill. refers to the hard propagated crops both in the traditional way and in in vitro conditions. At present, there are many economically valuable varieties of this plant used in the food and pharmaceutical industries. To meet the growing demand for this culture, it is necessary to optimize the clonal micropropagation technology as the most promising in comparison with the traditional method of cultivation.

S. chinensis представляет собой листопадную лиану, произрастающую на Дальнем Востоке, которую используют в пищевых и декоративных целях, а из семян получают БАВ. Особенности размножения этих культур в условиях

in vitro еще не достаточно изучены и на данном этапе представляют сложность в получении посадочного материала с использованием методов клонального микроразмножения. Для размножения *S. chinensis* используются традиционные методики размножения: семенами и корневыми отпрысками.

Для введения в культуры in vitro были использованы метамеры побега и почки *S. chinensis*.

С целью получения асептических эксплантов нами была проведена предстерилизационная и стерилизационная обработка растительного материала. Сперва донорные части *S. chinensis* промывались под проточной водой с мыльным раствором, после чего они помещались в 0,05 г/л раствор перманганата калия с экспозицией в 10 минут. Затем в условиях ламинарного бокса осуществлялась непосредственная стерилизация донорных частей, проводимая в соответствии с общепринятыми методиками [2].

Для введения и размножения данной культуры нами была использована модифицированная среда QL с содержанием мезоинозита в концентрации 100 мг/л, глицина – 2 мг/л, тиамина – 0,5 мг/л, пиридоксина – 0,5 мг/л, сахарозы – 20 мг/л и глюкозы 8 мг/л, агара – 5,0 г/л, а также регуляторов роста 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л и НУК 1 мг/л [3].



Рис. 1. *S. chinensis* на 30 день культивирования (слева); клональное микроразмножение на 47 день культивирования (справа)

Таким образом, в данной модифицированной питательной среде на этапах введения в культуру in vitro и клонального микроразмножения в

качестве источников углеводного питания нами были использованы сахара и глюкоза, а также изменено традиционное соотношение (10:1) цитокининов к ауксинам. Результаты текущего исследования показали, что на данной оптимизированной питательной среде удалось повысить коэффициент размножения до 3,7. Наблюдалось интенсивное побегообразование и ростовые процессы *S. chinensis*. Характерным моментом является то, что на этой среде был замечен рост побегов из пазушных почек, а также образование адвентивных почек (рис. 1).

Наше исследование показало, что использование приведенной в данной работе модифицированной питательной среды для культивирования *S. chinensis* в культуре *in vitro* показало широкие возможности для успешного внедрения методов клонального микроразмножения с целью массового получения посадочного материала для дальнейшего традиционного выращивания, а также оздоровления этого материала и повышения устойчивости растений к фитопатогенам [1].

Литература

1. Марамохин Э.В. Клональное микроразмножение лимонника китайского (*Schisandra chinensis* (TURCZ.) BAILL.) и элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (RUPR. & MAXIM.) MAXIM.) / Э.В. Марамохин, Д.Н. Зонтиков // Международная научно-практическая конференция «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» 23-25 июня 2016. ФГБНУ ВИЛАР г. Москва. 2016. С. 261–265.
2. Марамохин Э.В. *Schisandra chinensis* и представители Araliaceae в культуре *in vitro* / Э.В. Марамохин. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2016. 125 с.
3. Марамохин Э.В. Клональное микроразмножение некоторых лекарственных растений из семейства Schizandraceae и Araliaceae в культуре *in vitro* / Э.В. Марамохин // Ростовский научный журнал. 2017. № 7. С. 53–60.

**ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ,
СОДЕРЖАЩИХ МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА
ТРОМБОЦИТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА PDGFB ЧЕЛОВЕКА**

**CONSTRUCTION OF EXPRESSION VECTORS,
CONTAINING MUTANT VARIANTS OF HUMAN
PLATELET-DERIVED GROWTH FACTOR PDGFB GENE**

А.В. Мистерова, А.С. Герасимов

Вятский государственный университет, Киров, Россия

A.V. Misterova, A.S. Gerasimov

Vyatka State University, Kirov, Russia

Аннотация

Для лечения синдрома «диабетической стопы» в современной медицине успешно используется лекарственный препарат «Regranex Gel» на основе рекомбинантного тромбоцитарного фактора роста человека rhPDGFBB. К сожалению на сегодняшний день в России не производится биоаналогов данного препарата. Предыдущие эксперименты по получению rhPDGFBB в клетках *P. pastoris* показали, что нативный полипептид крайне нестабилен и гетерогенен в связи с неспецифическим гликозилированием. Следовательно, данная работа посвящена получению экспрессионных векторов, которые необходимы для создания новых штаммов продуцентов вариантов rhPDGFBB с улучшенными фармакологическими свойствами. В дальнейшем полученные результаты могут внести вклад в разработку новой перспективной отечественной технологии получения лекарственной субстанции rhPDGFBB для регенеративной медицины.

Abstract

For treating diabetic ulcers modern medicine successfully employs «Regranex Gel» drug based on human recombinant platelet-derived growth factor. Unfortunately, there are no bioanalogs manufactured in Russia at the moment. It has been shown in previous experiments that native rhPDGFBB produced in *P.pastoris* is highly unstable and heterogenous due to nonspecific glycosilation. This paper describes construction of expression vectors containing mutant forms of human PDGFB gene – a basis for new rhPDGFBB

production strains, which makes possible for the new improved technology of rhPDGFBB-based drug to be developed.

Цель

На 2015 год в России насчитывалось более 4 млн. человек с диагнозом «сахарный диабет». Эта болезнь сопровождается тяжелыми осложнениями, в числе которых т. н. синдром «диабетической стопы», который часто становится причиной ампутации конечностей. На сегодняшний день для лечения синдрома диабетической стопы успешно применяется препарат рекомбинантного тромбоцитарного фактора роста человека (rhPDGFBB), но этот препарат чрезвычайно дорог и не производится в России. Эксперименты по получению rhPDGFBB в клетках метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* показали, что полученный белок в своей природной форме крайне нестабилен и полностью разрушается за 3 дня при хранении на -20°C , даже в присутствии стабилизаторов. Было также обнаружено, что в процессе культивирования молекула rhPDGFBB подвергается неспецифическому *O*-гликозилированию клетками дрожжей, что вносит гетерогенность в получаемую белковую субстанцию. Исходя из этого, целью работы является создание экспрессионных векторов с мутантными формами гена PDGFB, позволяющих получать rhPDGFBB более высокого качества. Рассмотренные выше проблемы можно решить при помощи современных методов генной инженерии, внося определенные точечные мутации в целевой ген.

Методы

Наиболее вероятной причиной низкой стабильности rhPDGFBB является экспонирование на поверхности молекулы белка аргинина в 32 положении, который является мишенью для протеолитических ферментов. В первом мутанте заменой кодона CGT на кодон CCT (пролин) можно добиться исчезновения сайта протеолиза и, как следствие, увеличения стабильности молекулы (Cook et al., 1992). Было показано, что гидроксигруппа треонина в 109 положении является сайтом неспецифического *O*-гликозилирования, что и приводит к гетерогенности субстанции rhPDGFBB (Dai et al., 2015). Заменой кодона ACC на кодон GCC (аланин) достигается удаление этого сайта во втором мутанте. В третьем мутанте осуществлялась замена обоих кодонов.

Точечные мутации были внесены в целевой ген методом кросс-ПЦР с взаимноперекрывающимися праймерами при помощи высокоточной ДНК-полимеразы *Phusion (ThermoFisher)*. В ходе работы выяснилось, что введение даже одной точечной мутации серьезно влияло на специфичность праймеров, что приводило к синтезу нескольких неспецифических ПЦР-продуктов. Оптимизация условий ПЦР не привела к значимому увеличению специфичности праймеров. Было решено проводить препаративное электрофоретическое разделение фрагментов по длине, а затем вырезать фрагмент гена нужной длины с последующей очисткой при помощи набора Qiagen «Gel Extraction Kit». Очищенные фрагменты были подвергнуты гидролизу эндонуклеазами *XhoI* и *XbaI* и лигированы в экспрессионный вектор pVR2Xba с помощью T4 ДНК-лигазы.

Результаты

Были получены экспрессионные вектора, содержащие три варианта мутантного гена PDGFB – с заменой в 32 положении аргинина на пролин, с заменой в 109 положении треонина на аланин, и с двумя заменами. Правильность точечных замен была подтверждена секвенированием.

Выводы

Полученные экспрессионные вектора являются основой для создания новых штаммов продуцентов rhPDGFBB с улучшенными фармакологическими свойствами. Получение данных штаммов может внести значимый вклад в возможные будущие разработки перспективной отечественной технологии получения лекарственной субстанции PDGFBB для лечения синдрома «диабетической стопы».

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНОЙ ПОДЛОЖКИ ДЛЯ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПОЛИСАХАРИДНЫХ МИКРОЯЧЕЕК *

SURFACE MODIFICATION OF POLYMER WAFER FOR COVALENT IMMOBILIZATION OF POLYSACCHARIDE MICROWELLS

Р.А. Мифтахов, С.А. Лапа, А.В. Чудинов

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук (ИМБ РАН), Москва, Россия*

R.A. Miftakhov, S.A. Lapa, A.V. Chudinov

*Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

e-mail: chud@eimb.ru

Аннотация

Изучено влияние условий щелочной обработки пленок полиэтилентерефталата (ПЭТ) на поверхностную концентрацию карбоксильных групп, образующихся в результате гидролиза полимера. Обработка 1М КОН при комнатной температуре в течение всего 1 часа достаточно эффективно гидролизует поверхность ПЭТ пленки. При этом поверхность остается гладкой и блестящей, без видимых повреждений. Поверхностная концентрация активных карбоксильных групп оценивается как 10^4 молекул на 1 мкм^2 . В более мягких условиях поверхностная концентрация карбоксильных групп уменьшается. В более жестких условиях поверхностная концентрация карбоксильных групп не увеличивается, даже в условиях деградации поверхности ПЭТ пленки.

Abstract

The influence of alkaline treatment of of polyethylene terephthalate (PET) films on the surface concentration of carboxyl groups resulting from hydrolysis of the polymer, has been studied. The treatment with 1M KOH at room temperature for only 1 hour is sufficient to effectively hydrolyze the surface of the PET film. The surface remains

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-04-02062.

smooth and shiny, with no visible damage. The surface concentration of active carboxyl groups is estimated as 10^4 dye molecules per $1 \mu\text{m}^2$. The milder conditions decrease the surface concentration of carboxyl groups. In more severe conditions the surface concentration of carboxyl groups is not increased, even in the case when the surface of PET film became degraded.

Анализ нуклеиновых кислот с использованием олигонуклеотидных микрочипов применяется в клинической диагностике различных заболеваний. В качестве анализируемых образцов чаще всего используют амплифицированные с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагменты ДНК. В основе ПЦР лежит реакция ферментативного достраивания праймеров в соответствии со строением анализируемой матричной ДНК. Гибридизационный анализ продуктов ПЦР на матрице олигонуклеотидных зондов, находящихся в ячейках биочипа, позволяет одновременно получать совокупность параметров, свидетельствующих о строении анализируемого участка ДНК. Именно одновременный многопараметрический анализ единого образца ДНК ставит технологию биочипов в разряд перспективных высокочувствительных методов исследования нуклеиновых кислот.

Дальнейшим развитием технологии многопараметрического анализа ДНК является совмещение технологии ПЦР с технологией одновременно-го многопараметрического анализа единого образца, технологий биочипов. Для этого на биочипе должна быть организована параллельная множественная амплификации ДНК.

Праймеры иммобилизованы в гидрогелевой ячейке из кросс-сшитой крупнопористой агарозы за 5'-конец через расщепляемый линкер. Каждая пара праймеров иммобилизована в своей ячейке. Агарозные ячейки отделены друг от друга и закреплены на поверхности теплопроводящей полимерной подложке биочипа. Агарозные ячейки пропитывают раствором, содержащим анализируемый образец ДНК, ДНК-полимеразу, смесь дНТФ и флуоресцентный краситель «SYBR Green I» в ПЦР-буфере и покрывают слоем минерального масла. Масло полностью изолирует агарозные ячейки с содержащимся внутри раствором. В процессе термоциклирования праймеры отщепляются от агарозного носителя. Праймеры и все компоненты ПЦР находятся в растворе, в объеме жидкости внутри пор агарозной ячейки. Объем жидкости и реагентов внутри крупнопористой гидрофильной агарозной ячейки будет достаточно для амплификации ДНК и регистрации результатов. Процесс термоциклирования и регистрации проводится на одном приборе в режиме «реального времени». За ходом амплификации в каждой ячейке следят по увеличению

сигнала флуоресценции красителя «SYBR Green I» в каждой ячейке биочипа.

Целью настоящей работы является разработка метода активации поверхности твердого полимерного носителя, теплопроводящей тонкой пленки из полиэтилентерефталата (ПЭТ), которые могут рассматриваться в качестве подложки для агарозных ячеек с иммобилизованными праймерами.

Образцы прозрачной бесцветной пленки ПЭТ размером 25*75 мм толщиной 100 мкм обрабатывали раствором KOH. Сложноэфирные группировки, входящие в состав полимера, гидролизуются с образованием карбоксильных групп. Для оценки концентрации карбоксильных групп на поверхности пленки использовали метод флуоресцентного окрашивания и измерения сигнала флуоресценции методом флуоресцентной микроскопии. Карбоксильные группы активировали, переводили в пара-нитрофеноловые эфиры и связывали с флуоресцентным красителем. Для этого пленки обрабатывали раствором бис-паранитрофенилкарбоната в диметилсульфоксиде в присутствии диизопропилэтиламина, а затем обрабатывали раствором флуоресцентного индодикарбоцианинового красителя, аналога Cy5, содержащего в своем составе алифатическую аминогруппу. Схема модификации поверхности ПЭТ представлена на рис. 1.

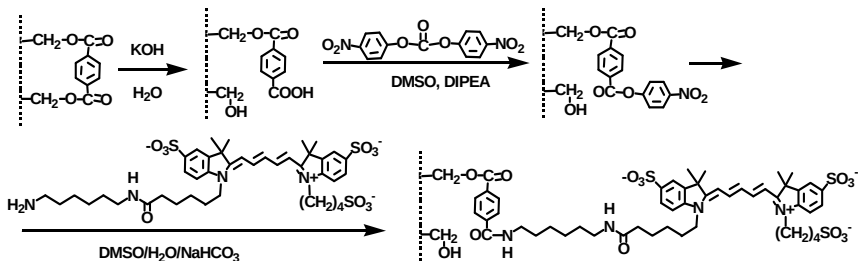


Рис. 1. Схема модификации поверхности полиэтилентерефталата

Для уменьшения неспецифического связывания с полимерной подложкой краситель использовали трисульфированный, хорошо растворимый в воде. Краситель синтезировали по схеме, представленной на рис. 2.

После окрашивания красителем, образцы пленки отмывали от несвязавшихся реагентов, а затем методом флуоресцентной микроскопии оценивали интенсивность окрашивания поверхности. Процедуры гидролиза, активации, окрашивания и отмывки от сорбировавшегося красителя были оптимизированы и отлажены до состояния стабильной воспроизводимости результатов. Для количественной оценки концентрации молекул кра-

сителя связавшихся с поверхностью подложки был изготовлен калибровочный чип с ячейками, содержащими тот же самый краситель с пошаговой убывающей концентрацией, и, соответственно, с пошаговой убывающей концентрацией молекул красителя на единице поверхности. Предел регистрации флуоресцентного микроскопа 1 молекула на 1 мкм^2 , надежное измерение 10 молекул красителя на 1 мкм^2 .

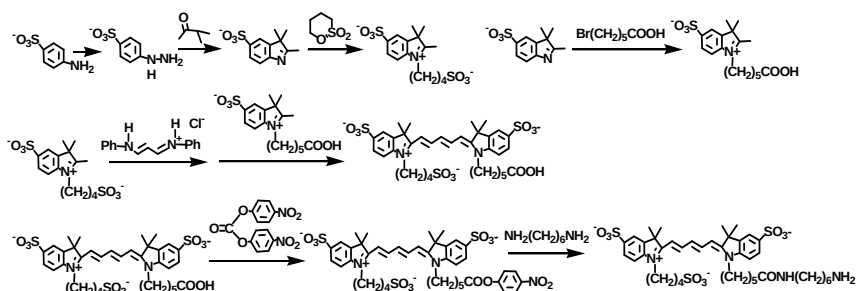


Рис. 2. Схема синтеза индодикарбоцианинового красителя

Изучали влияние условий щелочной обработки пленок полиэтилентерефталата (ПЭТ) на поверхностную концентрацию карбоксильных групп, образующихся в результате гидролиза полимера. Исследовали влияние концентрации КОН – 4М, 2М, 1М, 0,5М, 0,25М, 0,1М; температуры – 80оС, 60оС, 40оС, 20оС; времени щелочной обработки – 24 ч, 8 ч, 4ч, 2ч, 1ч. Параметры варьировали в различных комбинациях для выявления влияния изменяемого параметра при неизменности прочих параметров.

Найдено, что обработка 1М КОН при комнатной температуре в течение всего 1 часа достаточно эффективно гидролизует поверхность ПЭТ пленки. При этом поверхность остается гладкой и блестящей, без видимых повреждений. Поверхностная концентрация активных карбоксильных групп, определенная по связыванию с красителем, оценивается как 10^4 молекул красителя на 1 мкм^2 . В более жестких условиях поверхностная концентрация карбоксильных групп не увеличивается, даже в условиях деградации поверхности ПЭТ пленки. Видимо, это связано с деградацией поверхности и растворением верхнего слоя ПЭТ в щелочном растворе.

Концентрация активных карбоксильных групп, полученных на поверхности полимерной подложки из полиэтилентерефталата, достаточна для изготовления матрицы химически связанных с поверхностью ячеек агарозы.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КОНВЕРСИЯ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОДОБАВОК *

THE ENZYMATIC CONVERSION OF THE MYCELIAL BIOMASS TO CREATE SUPPLEMENTS

П.Ю. Мочалина, Е.М. Серба

*Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой
биотехнологии – филиал Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный научный центр питания,
биотехнологии и безопасности пищи», г. Москва, Россия*

P.Y. Mochalina, E.M. Serba

*Russian research Institute of food biotechnology is a branch
of Federal state budget institution of science «Federal research center
of food, biotechnology and food safety», Moscow, Russia*

Аннотация

Изучено влияние биокаталитического воздействия протеаз различного происхождения на биохимический и аминокислотный состав микробной биомассы. Получены новые экспериментальные данные по параметрам регулируемого процесса биодеструкции полимеров грибной биомассы для получения биологически активных добавок.

Abstract

The influence of biocatalytic effects of proteases of different origin on the biochemical and amino acid composition of microbial biomass. New experimental data on the parameters of the controlled process of biodegradation of polymers of fungal biomass for the production of biologically active additives.

В биомассе грибов и дрожжей содержатся значительное количество белковых веществ, ценных полисахаридов, в том числе хитин, что делает отходы производства привлекательным сырьем для получения

* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда № 16-16-00104.

биологически ценных препаратов. При этом наиболее высокое содержание хитино-глюканового комплекса отмечено в мицелиальных грибах рода *Aspergillus*. Содержание хитина в клеточных стенках грибов варьирует от 5 до 25 %, что существенно превышает его количество в дрожжевой биомассе и влияет на биологические функции препаратов, получаемых на основе ферментативной деструкции грибной биомассы

Проведены исследования по использованию биомассы микромицета *Aspergillus oryzae* как субстрата для получения биологически активных добавок на основе ферментативной конверсии субклеточных структур. Результаты сравнительного анализа состава полимеров биомассы в глубинных культурах рекомбинантных и мутантных штаммов *A. oryzae* позволили отобрать наиболее перспективные. Показано, что на вторые сутки роста количество полисахаридов в биомассе гриба *A. oryzae* 12-84 составило 34,3 г/100г, а в биомассе гриба *A. oryzae* 45-П12 – 31,5 г/100 г.

Полученные данные позволяют рассматривать биомассу микромицета *A. oryzae* 45-П12 – продуцента гидролитических ферментов как субстрат, содержащий полноценный белок и полисахариды, для создания пищевых и кормовых биодобавок.

Исследованы условия ферментативной деструкции субклеточных полимеров мицелиальной биомассы гриба *A. oryzae* под действием ферментативных систем, содержащих: β -глюканазу (300ед/г), протеазу бактериального происхождения эндо-действия (10 ед/г) и комплекс протеиназ и пептидаз грибного происхождения (10 и 15 ед. /г) в течение 18 ч. Проведен спектральный и аминокислотный анализы белковых веществ ферментоллизатов грибной биомассы, которые подтвердили, что с увеличением количества ферментов и времени их воздействия на образцы увеличивается содержание свободных аминокислот и низкомолекулярных пептидов до 92 % от общей массы веществ белковой природы, тогда как после двух часового гидролиза их количество составило 50 %, а после пяти часов – 68 %.

Результаты исследований подтверждают возможность проведения регулируемого процесса получения биопрепаратов с заданным структурно-фракционным составом на основе ферментативного гидролиза полимеров мицелиальной биомассы. Полученные ферментоллизаты грибной биомассы могут быть использованы для обогащения продуктов питания и кормов легкоусвояемыми низкомолекулярными пептидами, незаменимыми аминокислотами и углеводами.

ИЗУЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕРЕБРА И ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ОЗДОРОВЛЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ

USAGE OF SILVER NANOCOMPOSITES AND HUMIC ACIDS TO SANIFY POTATOES

О.А. Ножкина¹, А.И. Перфильева¹, А.В. Сидоров¹,
И.А. Граскова¹, Б.Г. Сухов²

¹ *Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН*

² *Иркутский институт химии СО РАН*

O.A. Nozhkina¹, A.I. Perfiljev¹, A.V. Sidorov¹, I.A. Graskova¹, B.G. Sukhov²

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
of Siberian Branch of Russian Academy of Science*

² *Irkutsk Institute of Chemistry of Siberian Branch
of Russian Academy of Science*

e-mail: alla.light@mail.ru, smallolga@mail.ru

Аннотация

Синтезированы наноконпозиты, состоящие из наночастиц серебра, упакованных в гуминовые кислоты трех видов (НК ГК 26, НК ГК 27, НК В VI). Проведено исследование по влиянию самих наноконпозитов и их предшественников (нитрат серебра и гуминовые кислоты: грязи, сланцы, угли) на возбудитель кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. С применением витальных красителей с использованием просвечивающего микроскопа выявлено наличие бактерицидного эффекта у части исследуемых наноконпозитов. Показано, что после инкубации бактерий с наноконпозитом изменяется морфология клеток: они укорачиваются и утолщаются. Наноконпозиты снижают оптическую плотность бактериальной суспензии и ингибируют биопленкообразование бактерий.

Abstract

Nanocomposites consisting of silver nanoparticles packed into humic acids of three types have been synthesized (NC HA 26, NC HA 27, NC B VI). The research into the effect of nanocomposites and their predecessors (silver nitrate and humic acids: mud, shales and coals) on the agent of potatoring rot *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* has been conducted. Presence of the bactericidal effect in the part of the nanocompo-

sites under study has been revealed using vital dyes and transmission microscope. It has been shown that the morphology of cells changes after incubation of bacteria with nanocomposite: they become shortened and thickened. Nanocomposites reduce the optical density of bacterial suspension and inhibit biofilm formation of bacteria.

Бактерия *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) вызывает кольцевую гниль клубней картофеля, нанося при этом огромный ущерб сельскому хозяйству. Cms – неспорозные, неподвижные, палочкообразные грамположительные бактерии размером 0,5-1,0 мкм, одиночные или соединенные попарно, либо в короткие цепочки. Бактерии распространяются по сосудам ксилемы картофеля, образуют биопленку, которая нарушает транспорт воды в верхнюю часть стебля. Это приводит к завяданию – типичному симптому заболевания. Развивается хлороз листьев, на них появляются некротические пятна, что в дальнейшем может привести к гибели растения. Бактерии способны зимовать в виде засохшей слизи на инвентаре, а также в пораженных растительных остатках и тем самым передаваться из поколения в поколение. До сих пор все меры по профилактике заболевания сводятся лишь к обеззараживанию хранилищ, тары, инвентаря и посадочного материала. Поэтому необходим поиск новых эффективных средств и способов для оздоровления картофеля, не оказывающих вредного влияния. Известно, что наночастицы серебра обладают антибактериальным и противоопухолевым действием. Предполагается, что наночастицы серебра найдут применение в сельском хозяйстве в качестве средств антимикробного действия для обработки растений.

В качестве матриц наночастиц для синтеза НК используют множество соединений, в том числе природных. Так, ранее нами был показан бактерицидный эффект НК селена и природного полисахарида арабиногалактана. Интересно изучение эффекта НК, имеющих в своем составе вещества полезные для растений, например, гуминовые вещества (ГВ). Известно, что ГВ в водных растворах представляют собой полианионы, которые, благодаря наличию большого количества функциональных групп, могут электростатически взаимодействовать с поверхностью наночастиц, а также связывать их за счёт комплексообразования. ГВ не обладают токсичностью, являются устойчивыми в течение длительного времени. Это стимуляторы роста растений и почвообразующей биоты, красители, ингибитор коррозии и др. Обработка ГВ щелочными металлами переводит их в водорастворимые соли, что позволяет существенно повысить их биологическую активность.

Целью нашей работы являлось изучение антибактериального действия нанокмппозитов серебра с различными матрицами в виде гуминовых ки-

слот на фитопатогенную бактерию *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, как потенциальными средствами оздоровления растений от бактериальных патогенов.

В настоящей работе были исследованы НК следующих видов:

- 1) НК серебра в гуминовой кислоте из сланцев (НК ГК В VI);
- 2) НК серебра в гуминовой кислоте из грязей (НК ГК 26);
- 3) НК серебра в гуминовой кислоте из сланцев (НК ГК 27);

Также были исследованы предшественники нанокompозитов:

- 1) AgNO_3 ;
- 2) Грязи;
- 3) Сланцы;
- 4) Угли.

НК серебра на основе гуминовых кислот получали следующим способом. К водно-щелочному раствору гуминовых кислот (0,45г в 30мл 0,2 % NaOH) добавили раствор AgNO_3 (0,1г в 5мл воды). Смесь перемешивали, далее нагревали на водяной бане до температуры 90°C в течение 15 минут. После смесь охлаждали и высаживали с применением этилового спирта. Осадок отфильтровали, промыли несколько раз на фильтре этиловым спиртом и высушили. Выход нанокompозита составил: ГК26 – 78 %, ГК27 – 99 % с содержанием серебра 12 %. Все НК хорошо растворимы в воде и удобны в использовании.

Исследования проводились на бактериях *Clavibacter michiganensis* subsp. *sependonicus* штамм Ac 1405 (Spieckermann and Kotthoff 1914) Davis et al. 1984 Ac-1405, вызывающий кольцевую гниль клубней картофеля был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов, ИБФМ РАН. Бактерии выращивали на среде следующего состава: Казеин-пептон 10 г/л; дрожжевой экстракт 5 г/л; глюкоза 5 г/л; хлорид натрия 5 г/л; агар 20 г/л с pH 7.0 – 7.2. Пробирки со скошенным агаром помещали в термостат с температурой 25°C для выращивания бактерии.

Изучение бактерицидного эффекта нанокompозитов осуществляли путем выращивания бактерии на жидкой среде в течение суток, за тем инкубировали 1 сутки с нанокompозитами. После чего исследовали жизнеспособность клеток с применением витальных красителей. Жизнеспособность клеток бактерий определяли методом двойного окрашивания флуоресцентными красителями: флуоресцерин диацетата (fluorescein diacetate, FDA) в конечной концентрации 50 мкМ («Sigma», Германия) и пропидий йодида (propidium iodide, PI) в конечной концентрации 7,5 мкМ («Biotium», США). Наличие бактериостатического эффекта нанокompозитов исследовали по измерению оптической плотности бактериальной суспензии при длине волны 595 нм после инкубации бактерий с нанокompозитами и их

предшественниками в течение 1 суток. Интенсивность биопленкообразования бактериями после инкубации с наноккомпозитом определяли с применением планшетного метода.

По литературным данным наночастицы и наноккомпозиты серебра востребованы в медицинских исследованиях. Известно, что антимикробное действие серебра эффективно против примерно 650 штаммов бактерий. Показано, что наночастицы серебра являются сильным токсическим агентом, подавляющим жизнеспособность различных видов грибов, таких как: *Aspergillus*, *Malassezia*, *Candida albicans*.

Нами были получены следующие данные (рис. 1).

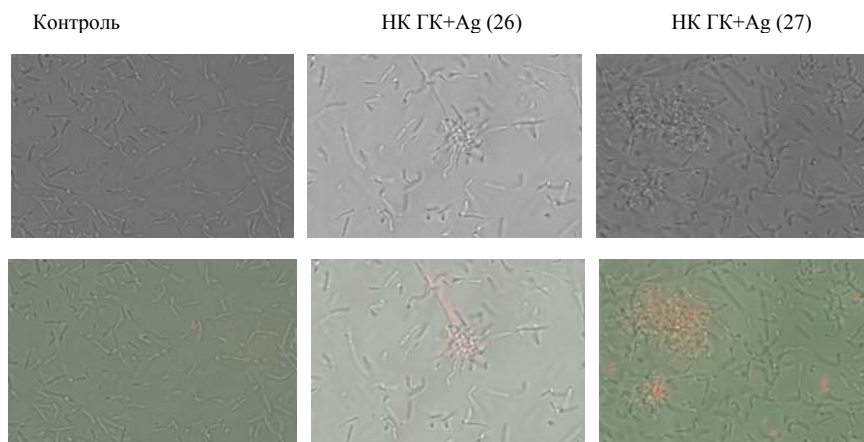


Рис. 1. Влияние наноккомпозитов серебра на основе гуминовых кислот (ГК) и серебра жизнеспособность бактерии *Cms* (нижний ряд картинок демонстрирует окрашивание мертвых клеток красным цветом)

Было выявлено, что при инкубации *Cms* с ГК (B2) и ГК (26) наблюдалось множество мертвых клеток. Причем в варианте с ГК (26) бактериальные клетки слипались, образуя крупные конгломераты. В конгломератах все клетки были мертвыми.

Была проведена статистическая обработка результатов (рис. 1, а, б, в). Было выявлено, что при инкубации бактерий с наноккомпозитами серебра стабилизированными гуминовыми кислотами длина бактериальных клеток по сравнению с контролем уменьшается, а ширина увеличивается (рис. 2, 3).

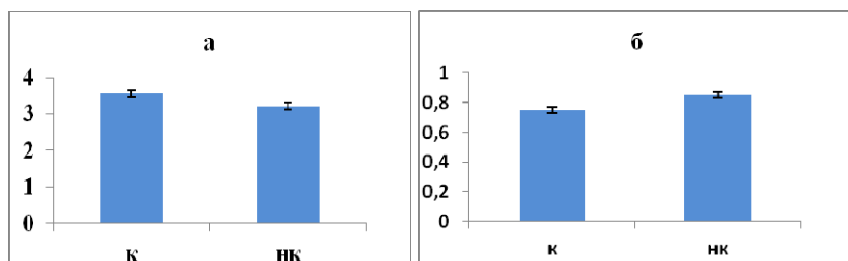


Рис. 2. Влияние нанокмпозитов серебра на основе гуминовых кислот (ГК26) и серебра на длину (а) и ширину (б) клеток бактерии *Cms*

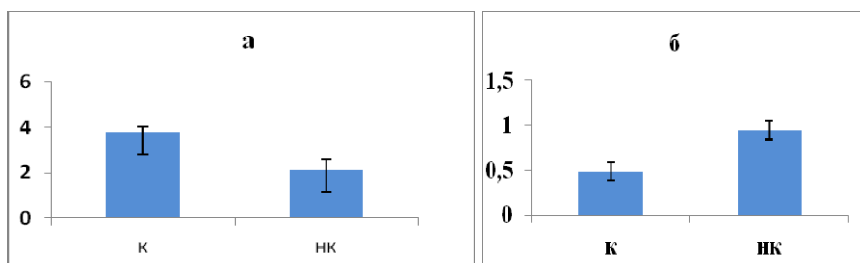


Рис. 3. Влияние нанокмпозитов серебра на основе гуминовых кислот (ГК27) и серебра на длину (а) и ширину (б) клеток бактерии *Cms*

Так же были проведены эксперименты по оптической плотности и био-пленкообразованию для определения бактерицидного свойства гуминовых кислот и их предшественников.

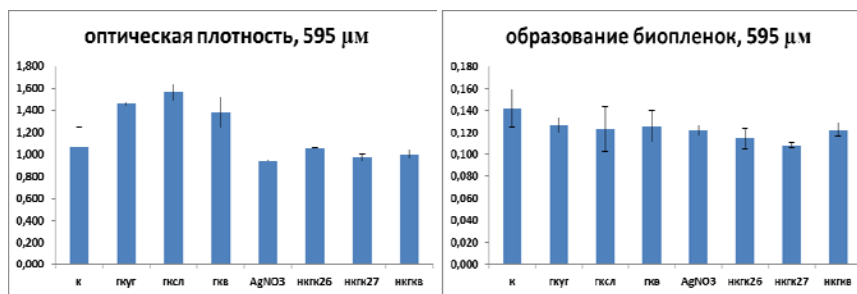


Рис. 4. Влияние нанокмпозитов в гуминовых кислотах (НКГК26, НКГК27, НКВ) и их предшественников (ГКугли, ГКсланцы, ГКВ и AgNO₃) на образование биопленок и оптическую плотность бактерий

Проведенные опыты показали, что при инкубировании бактерий *Sts* с нанокompозитами селена и серебра в различных матричных оболочках (арабиногалактан, крахмал и гуминовые кислоты), бактерии испытывают стресс, который в последствии приводит к их гибели, что подтверждается данными, полученными при использовании витальных красителей. Имеющиеся фотографии и графические изображения позволяют наблюдать изменение морфологии и жизнеспособности бактериальных клеток после инкубации с нанокompозитами по сравнению с контролем. В естественных условиях бактерии обычно испытывают недостаток питательных веществ, поэтому на практике возможно использование нанокompозитов, как питательное средство для бактерий с адресной доставкой частиц селена или серебра, нарушающее в последствии жизнедеятельность бактериального патогена и приводящая к его гибели. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования исследуемых нанокompозитов для обработки растений против бактериальных заболеваний.

**ПРИРОДНЫЕ АБЗИМЫ КРОВИ – НОВЫЕ МАРКЕРЫ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
И АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ***

**NATURAL BLOOD ABZYMES – NEW MARKERS FOR DIFFERENTIAL
DIAGNOSTICS OF HIV/AIDS AND AUTOIMMUNE PATHOLOGIES**

Е.С. Одинцова, А.М. Тимофеева, С.В. Баранова

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

E.S. Odintsova, A.M. Timofeeva, S.V. Baranova

SB RAS ICBFM, Novosibirsk, Russia

Аннотация

Данное исследование направлено на разработку новых универсальных подходов диагностики и персонализированной медицины аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, системная красная волчанка) и патологий, при которых происходит развитие аутоиммунных процессов (ВИЧ-инфекция). Изучена корреляция клинических симптомов ВИЧ-инфекции и аутоиммунных патологий с содержанием в крови пациентов антител против инфекционных агентов, ДНК, некоторых белков человека (гистонов, основного белка миеллина), а также наличием каталитической активности антител, гидролизующих ДНК и белки.

Abstract

The study is aimed at developing of new universal approaches for diagnostics and personalized medicine for autoimmune diseases (multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus) and pathologies in which autoimmune processes develop (HIV infection). In this work we investigated the correlation of clinical symptoms of HIV-infection and some autoimmune pathologies with the content of antibodies against infectious agents, DNA, some human proteins (histones, myelin basic protein) in the blood of patients, and the presence of DNA- and protein-hydrolyzing activities.

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

Существование каталитически активных антител (абзимов) известно уже более 20 лет. В литературе описаны антитела, способные расщеплять нуклеиновые кислоты, белки и полисахариды. Наличие абзимов, распознающих антигены хозяина, связано с аутоиммунными и некоторыми вирусными заболеваниями, которые сопровождаются аутоиммунными процессами. Согласно сложившимся представлениям наличие в крови каталитически активных иммуноглобулинов является четким и ранним признаком протекания этих процессов в организме человека.

Данная работа посвящена изучению корреляции клинических симптомов ВИЧ-инфекции и аутоиммунных патологий с содержанием в крови пациентов антител против различных инфекционных агентов, ДНК, некоторых белков человека (гистонов, основного белка миелина), а также наличием каталитической активности антител, гидролизующих ДНК и белки.

Нами ранее показано, что каталитическая активность антител крови ВИЧ-инфицированных больных коррелирует с характером течения ВИЧ-инфекции, при этом, при быстрой и медленной прогрессии заболевания отличаются профили гидролиза ДНК и казеина (протеолитическая активность). Также показано, что препараты поликлональных IgG и IgM из крови ВИЧ-инфицированных больных содержат фракцию антител, которые с высокой эффективностью гидролизуют интегразу и обратную транскриптазу ВИЧ, и, возможно, имеют защитные функции. Установлено, что иммуноглобулины (IgG и IgM) крови ВИЧ-инфицированных больных, специфически гидролизующие интегразу вируса, значительно ингибируют катализируемые ею реакции 3'-процессинга и интеграции – ключевые стадии жизненного цикла вируса.

Иммуноферментным анализом обнаружено, что сыворотки ВИЧ-инфицированных больных содержат аутоантитела против гистонов и ОБМ. Было проанализировано 29 препаратов антител из крови больных с ВИЧ-инфекцией, из них 79 % и 93 % проявляли достоверно тестируемую каталитическую активность в реакции гидролиза ОБМ и гистонов соответственно. Изучение каталитических свойств антител (выявление типа протеолитической активности, сродство к субстратам, металл- и pH-зависимость) показало зависимость свойств от стадии и течения заболевания. У больных на стадии заболевания пре-СПИД степень гидролиза ОБМ и гистонов была выше, чем у пациентов на стадии генерализованной лимфаденопатии.

Ранее показано наличие анти-ОБМ абзимов-протеаз при рассеянном склерозе (РС). Кроме нашей лаборатории, такое исследование проводилось в лаборатории А.Г. Габилова (ИБХ РАН, Москва), ими были установлены 4 иммунодоминантных участка в субстрате – ОБМ

(Ponomarenko et al. 2002, 2004–2006), по которым происходит гидролиз белка антителами. Нами впервые показано, что антитела крови больных системной красной волчанкой (СКВ) специфично гидролизуют основной белок миелина.

Установлено, что IgG, содержащие легкие цепи как типа κ (каппа), так и λ (лямбда), а также каталитически активные иммуноглобулины всех подклассов (IgG1–IgG4), гидролизуют ДНК и основной белок миелина при инфекционных заболеваниях, СКВ и РС, причем относительная активность изменяется в зависимости от заболевания. Существенно отличается вклад в суммарную активность различных изотипов IgG с учетом их содержания в крови.

Согласно полученным нами данным, в отличие от антител больных рассеянным склерозом, каталитически активные антитела больных системной красной волчанкой в большей степени представлены металлопротеазами и в меньшей степени – сериновыми протеазами, они существенно отличаются по ферментативным свойствам от антител больных рассеянным склерозом. Суммарный пул антител крови ВИЧ-инфицированных больных, также содержит абзимы с активными центрами, подобными сериновым и металлопротеазам. Кроме того выявлено значительное ингибирование активности йодацетомидом, что указывает на наличие в суммарном пуле антител тиоловых протеаз.

Проверка ряда общепринятых критериев принадлежности исследуемых активностей антителам показала, что ДНКазная и протеолитическая активности являются собственным свойством изученных антител.

Дальнейшие исследования направлены на разработку новых универсальных подходов дифференциальной диагностики аутоиммунных заболеваний (рассеянный склероз, системная красная волчанка) и патологий, при которых происходит развитие аутоиммунных процессов (ВИЧ/СПИД). Будет проведен анализ факторов, стимулирующих развитие аутоиммунных процессов, а также будет изучено влияние медикаментозной терапии на исследуемые биохимические параметры.

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ
СРЕД НА СКОРОСТЬ ДОСТИЖЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО ВОЗРАСТА
НЕПАРНЫМ ШЕЛКОПРЯДОМ (*LYMANTRIA DISPAR* L.)**

THE INFLUENCE OF VARIOUS ARTIFICIAL NUTRITION ON THE
SPEED OF ACHIEVING THE TARGET AGE OF GIPSY-MOTH

О.В. Охлопкова¹, А.А. Моисеева¹, В.Е. Кузнецов¹, К.А. Худеева²

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

² Национальный исследовательский Томский политехнический
университет, Россия

O.V. Okhlopkova¹, A.A. Moiseeva¹, V.E. Kuznetsov¹, K.A. Khudeeva²,

¹ SRC VB «Vector», Russia

² NR TPU, Russia

E-mail: ohlopkova_ov@vector.nsc.ru

Аннотация

В процессе исследования проводилось изучение влияния различных бобовых культур на увеличение скорости роста гусениц непарного шелкопряда (*Lymantria dispar* L.), а также определение чувствительности выращенных на исследуемых питательных средах гусениц непарного шелкопряда к вирусу ядерного полиэдроза (сем. *Baculoviridae*).

Abstract

In the course of the study, the influence of various artificial nutrition with different beans on the growth rate of gipsy-moth (*Lymantria dispar* L.) and the sensitivity of this insect to the nuclear polyhedrosis virus (*Baculoviridae*) were studied.

Основная нагрузка на биосферу в рамках защиты леса в лесном хозяйстве оказывается посредством применения химических пестицидов в борьбе с вредителями, к примеру, с непарным шелкопрядом, который является обширным полифагом и карантинным насекомым. Это значит, что лес, который подвергся воздействию вспышки непарного шелкопряда,

нельзя использовать в лесоперерабатывающей промышленности, что крайне негативно для Западносибирского региона. Для того чтобы минимизировать вред от токсичных химических пестицидов, ведется активная разработка методов биологической защиты растений. Знания в области биологии помогают широко использовать многих естественных врагов насекомых для контроля численности вредителей. В частности широко используются энтомопатогенные препараты на основе вирусов семейства *Baculoviridae*. Наиболее эффективным представителем данного семейства является вирус ядерного полиэдроза (ВЯП).

Особенностью производства препаратов на основе бакуловирусов является то, что наработка вирусных частиц возможна только в живом организме, что ставит инсектарий на одно из важнейших мест в производственной схеме. Кроме того, для любого производства важными являются критерии эффективности технологии. Увеличение скорости роста насекомых в инсектарии позволит сократить затраты на их содержание. Состав искусственной питательной среды (ИПС) является важным параметром, который не только влияет на скорость роста насекомых, но и легко поддается изменению и контролю.

Поэтому целью данной работы стало установление скорости достижения III возраста непарным шелкопрядом при культивировании на искусственных питательных средах с различными составами.

В качестве объекта исследования в работе использовались гусеницы непарного шелкопряда (НШ). Грена НШ была собрана во второй декаде октября 2015–2016 гг. в очаге массового размножения насекомых в Ордынском районе Новосибирской области.

В работе использовались три искусственные питательные среды различного состава для культивирования гусениц непарного шелкопряда. Качественные составы сред представлены в табл. 1.

Таблица 1

Качественные составы ИПС, используемых в работе

Кукурузная ИПС	Гороховая ИПС	Чечевичная ИПС
Мука кукурузная	Бобы гороха	Чечевица
Мука соевая	Бобы фасоли	Мука ржаная
Аскорбиновая кислота	Мука рисовая	Мука гречневая
Дрожжи кормовые	Крупа манная	
	Комплекс витаминов и минералов	
10 % спиртовой раствор бензойной кислоты		
Агар-агар		
Вода дистиллированная		

В ходе исследования каждые сутки проводился учет возрастов личинок непарного шелкопряда. Время достижения целевого возраста в исследуемых группах представлено на рис. 1.

Рис. 1 показывает, что все три ИПС имеют схожий результат, однако ИПС на чечевицином субстрате обладает лучшей тенденцией. Кроме того, в ходе эмпирического анализа внешнего вида насекомых было отмечено, что гусеницы непарного шелкопряда, выращенные на среде с чечевицей были более активными и выглядели лучше, чем гусеницы, выращенные на гороховом субстрате. Кукурузный экстракт показал в данном случае худший результат по скорости роста и средний результат по внешнему виду гусениц.

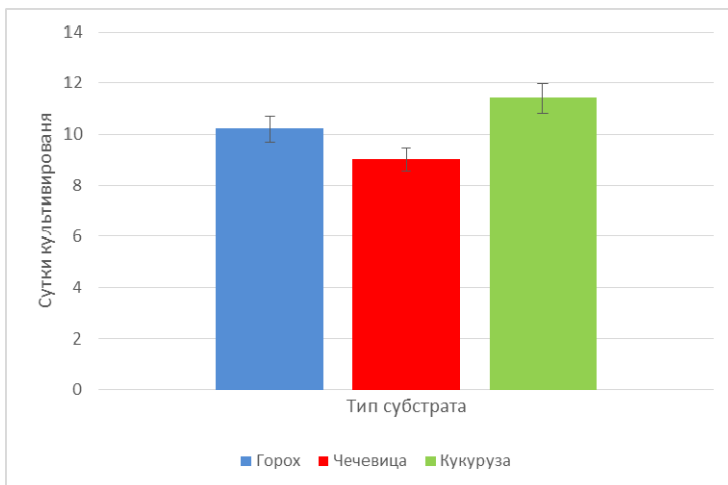


Рис. 1. Время достижения (сутки) целевого возраста гусеницами непарного шелкопряда при культивировании на исследуемых ИПС.

Для объяснения данных показателей был произведен теоретический анализ энергетического состава используемых в работе ИПС. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Теоретический анализ энергетического состава ИПС, мг.

	Горох	Чечевица	Кукуруза
Белки	5090	30450	16395
Жиры	830	1392	2310
Углеводы	44330	53560	48255

Как видно из табл. 2, гороховый субстрат обладает наименьшими показателями по наличию основных обогатителей. Мы предполагаем, что это оказывает существенное влияние на образование гемолимфы насекомого и формирование жирового тела, так как данным тканям для формирования необходимо большое количество белков, жиров и углеводов.

Для инфицирования насекомых применяли ВЯП НШ-2-85. На ИПС соответствующего вида наносили вирусную суспензию и культивировали на ней насекомых. Причину гибели гусениц устанавливали микроскопическим методом. Данные о гибели гусениц представлены в табл. 3.

Таблица 3

**Время смерти гусениц непарного шелкопряда
после заражения (дней)**

	Горох	Чечевица	Кукуруза
Среднее время после заражения	10	9	11

Как видно из табл. 3 все гусеницы, культивируемые на исследуемых средах, не потеряли чувствительность к ВЯП НШ. При проведении микроскопического исследования было выявлено, что гибель гусениц, выращенных на гороховом субстрате, не во всех случаях была вызвана вирусом. Это может быть связано с тем, что данные гусеницы отличались от остальных по внешним признакам, выглядели более болезненными. Мы предполагаем, что это могло быть вызвано энергетическими и водными недостатками ИПС на гороховом субстрате. Гибель же гусениц на ИПС с чечевичным субстратом, несомненно, связана с ВЯП НШ.

В целом хочется отметить общую благоприятную тенденцию использования чечевичного компонента. Гусеницы на нем растут быстрее, хорошо нарабатывают жировое тело, которое впоследствии является основными тканями, в которых происходит репликация вирусной стро-
мы. Также при наличии хорошего здорового роста, гусеницы легко подвержены заражению, проявляют достаточную чувствительность к ВЯП НШ.

ДИЗАЙН НЕВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ПЕРЕНОСА ДНК В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

DESIGN OF NONVIRUS VECTORS FOR DNA DELIVERY INTO MAMMALIAN CELLS

М.Б. Пыхтина, В.П. Романов,
С.М. Мирошниченко, А.Б. Беклемишев

*Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Научно-исследовательский
институт биохимии», Россия*

M.B. Pykhtina, V.P. Romanov,
S.M. Miroshnichenko, A.B. Beklemishev
Research Institute of Biochemistry, Russia

e-mail: Pykhtina_maria@mail.ru

Аннотация

В настоящей работе были сконструированы рекомбинантные химерные полипептиды, содержащие полноразмерные аминокислотные последовательности гистона H2A и аполипопротеина A-I (апоA-I) человека, а также пептида PTD-4 (аналога TAT). Продемонстрирована возможность использования полученных химеров для переноса генетического материала в ядра клеток млекопитающих линии HEK 293T.

Abstract

In the present work, recombinant chimeric polypeptides containing the full-length amino acid sequences of histone H2A and human apolipoprotein A-I (apoA-I), as well as PTD-4 peptide (analogue of TAT) have been constructed. The possibility of using the obtained chimeras for the transfer of genetic material into the nuclei of mammalian cells of the HEK 293T line is demonstrated.

Цель исследования – разработка невирусных рекомбинантных векторов для переноса целевых генов в клетки эукариот на основе химерных полипептидов PTD-АпоAI-H2A и H2A-АпоAI-H2A, состоящих из

нескольких полипептидных модулей: (а) гистона H2A человека, используемого в качестве ДНК-связывающего домена и компонента, обуславливающего внутриклеточное и внутриядерное проникновение ДНК; (б) аполипопротеина А-I (апоА-I) человека, обуславливающего связывание комплекса ДНК-химер с липидами и, таким образом, защиту ДНК от нуклеаз; (в) пептида РТD-4, являющегося аналогом ДНК-трансдуцирующего домена белка ТАТ ВИЧ и обеспечивающего внутриклеточную интернализацию комплекса.

Были спроектированы и синтезированы гены двух вариантов химерных полипептидов (РТD-АроАI-H2A и H2A-АроАI-H2A) и гистона H2A человека. Гены были клонированы и экспрессированы в клетках *E.coli* BL21 (DE3). Полученные рекомбинантные полипептиды обладали расчетной молекулярной массой и составляли не менее 30 % от общего содержания белков в клетке. Анализ субклеточных фракций показал, что химерные белки были локализованы, преимущественно, в клеточном дебрисе, гистон H2A- в тельцах включения.

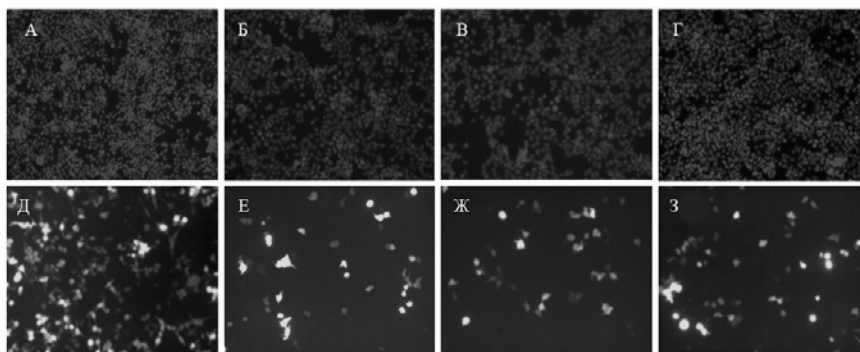


Рис. 1. Флуоресцентная микроскопия клеток НЕК 293Т, трансфицированных комплексами рекомбинантных полипептидов H2A, РТD-АроАI-H2A и H2A-АроАI-H2A с плазмидной ДНК рEGFP-N1. Увеличение 200х. (А, Б, В, Г) окрашенные DAPI ядра клеток; (Д, Е, Ж, З) – трансфицированные клетки, синтезирующие белок GFP; (Д) – Lipofectamine 2000/ рEGFP-N1; (Е) – H2A/ рEGFP-N1 молярное соотношение 8000/1; (Ж) – РТD-АроАI-H2A/ рEGFP-N1 молярное соотношение 8000/1; (З) – H2A-АроАI-H2A/ рEGFP-N1 молярное соотношение 8000/1

Очистку рекомбинантных химерных белков проводили с помощью двухэтапной ионообменной хроматографии на смолах Macro-Prep DEAE

и Macro-Prep CM фирмы Bio-Rad (USA). Методом гель-ретардации ДНК было установлено, что полученные химерные полипептиды и рекомбинантный гистон H2A обладают способностью связывать плазмидную ДНК pEGFP, причём, химерный белок H2A-ApoA1-H2A обладает наибольшей аффинностью к ДНК. Трансфекционную активность комплексов ДНК-химерный полипептид исследовали на клетках НЕК 293Т. Уровень трансфекции клеток в случае применения в качестве невирусных переносчиков ДНК рекомбинантных полипептидов H2A-ApoA1-H2A, РТD-ApoA1-H2A и H2A составил 5 %, 3,5 %, 5,5 %, соответственно, в то время как с использованием липофектамина 2000 уровень трансфекции составил 55 % клеток (рис. 1).

Однако, несмотря на то, что исследованные химерные полипептиды проявляют существенно более низкую трансфецирующую активность в сравнении с липофектамино, они обладают существенным по сравнению с искусственными трансфектантами преимуществом – являются нетоксичными для организма. В этой связи представляется целесообразным исследовать в дальнейшем возможность их использования для переноса генов в условиях *in vivo*.

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ В НОРМЕ И ПРИ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЯХ *

BISPECIFIC ANTIBODIES IN NORM AND IN AUTOIMMUNE PATHOLOGIES

В.В. Принц¹, С.Е. Седых^{1,2}, Г.А. Невинский^{1,2}

¹ *Новосибирский государственный университет, Россия*

² *Институт химической биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения РАН, Россия*

V.V. Prinz¹, S.E. Sedykh^{1,2}, G.A. Nevinsky^{1,2},

¹ *Novosibirsk State University, Russia*

² *SB RAS ICBFM, Russia*

e-mail: pvstein@mail.ru

Аннотация

Биспецифичными называют иммуноглобулины, содержащие два разных антигенсвязывающих центра и способные связывать два разных антигена. Показано, что природные биспецифичные иммуноглобулины появляются в крови при ревматоидном артрите, аутоиммунном тиреоидите, миастении. Данная работа посвящена изучению природных биспецифичных иммуноглобулинов в норме и при развитии патологических аутоиммунных процессов.

Abstract

Bispecific antibodies contain two different antigen-binding sites and bind two different antigens. Natural bispecific antibodies were found in the blood serum in rheumatoid arthritis, Hashimoto thyroiditis, myasthenia gravis. This work is devoted to the study of natural bispecific antibodies norm and during autoimmune processes.

* Работа поддержана грантами РФФИ 16-34-60066 мол_а_дк, 16-04-00603, а также грантом Президента РФ МК МК-410.2017.4.

Природные биспецифичные иммуноглобулины обнаружены в молоке, плаценте и крови здоровых доноров. Показано, что химерные биспецифичные молекулы IgG представлены всеми подклассами (IgG1-IgG4). Определено содержание биспецифичных IgG, а также соотношение биспецифичных IgG к моноспецифичным.

Биспецифичные IgG при ревматоидном артрите связывают циклический цитруллинированный пептид и IgG, при тиреоидите Хашимото – тиреоглобулин и тиреоидную пероксидазу, при миастении – мышечные киназы.

Согласно литературным данным, одновременная экспрессия двух генов легких цепей в одном клоне В-лимфоцита возможна при хронической лимфоцитарной лейкемии, в клетках гибридом, и в случае индуцированной плазматомы. Вероятно, эти процессы связаны с вторичной перестройкой генов иммуноглобулинов и с тем, что некоторые периферические популяции В-лимфоцитов избегают аллельного исключения.

Обнаруженные нами природные биспецифичные IgG, образуются в организме человека *in vivo* в результате обмена иммуноглобулинов HL-фрагментами. Полученные данные указывают на то, что данный процесс в крови, молоке и плаценте человека происходит между IgG всех подклассов, а также на возможную роль обмена HL-фрагментами при беременности и лактации.

ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫСШИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

STUDY OF BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF HIGHER BASIDIOMYCETES

А.А. Приставка, З.А. Ефременко, М.Ю. Неустроев

*ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет»,
Иркутск, Россия*

A.A. Pristavka, Z.A. Efremenko, M.Y. Neustroev

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Аннотация

Исследованы культурально-биохимические и биотехнологические характеристики штаммов базидиальных грибов для оценки их потенциального использования в получении древесного биокompозита.

Abstract

The cultural, biochemical, and biotechnological properties of basidiomycetes strains have been studied in order to assess their prospective utilization in the production of wood biocomposites.

Одна из важнейших проблем рационального природопользования – утилизация лигноцеллюлозных отходов, которые образуются в различных секторах экономики (АПК, ЛПК, перерабатывающая промышленность и т. д.). Наиболее перспективными считаются биотехнологические методы микробной деградации растительной биомассы, однако это сложный многоступенчатый процесс, который зависит от набора экзоферментов, их удельной и абсолютной активности. Поэтому постоянно осуществляется поиск новых, биотехнологически эффективных штаммов продуцентов. В этом плане крайне перспективно использование ксилотрофных базидиомицетов, которые, благодаря мощной полиферментной системе, позволяют не только эффективно разлагать лигно-

целлюлозное сырье, но и получать на его основе новые композитные материалы.

В ходе исследований был проведен скрининг 7 видов грибов (*Inonotus obliquus*, *Trametes hirsutus*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor* – изолированных из лесных экосистем Иркутской области; коллекционный штамм *Fomitopsis pinicola*; коммерческий штамм *Lentinula edodes*) по способности расти на нативном древесном субстрате. Культивирование проводилось на древесных блоках хвойных пород без добавления дополнительных индукторов роста при 27 °C и влажности 80 % в течении 1 месяца. Виды, показавшие наиболее заметный рост, – *T. hirsutus*, *P. ostreatus*, *L. edodes*, – исследовались на способность продуцировать ферменты лигноцеллюлазного комплекса в условиях глубинного культивирования на среде Чапека-Докса. В качестве индукторов синтеза целлюлаз и лигниназ в среду параллельно добавляли несколько видов растительного сырья в концентрации 0,5 % (смесь опилок хвойных и лиственных пород, пшеничная солома, биомасса нитчатой водоросли *Spirogyra* sp. из озера Байкал). Культивирование проводили в динамических условиях на качалке при 120 об/мин и температуре 25±1 °C в течение 14 суток. Начиная с третьих суток отслеживалась динамика накопления внеклеточного белка, общей целлюлазной активности, а также активности ферментов лигниназного комплекса (лигниназы и лакказы).

Пики активности для всех исследованных видов ферментов у всех продуцентов были зафиксированы на 5-6 сутки культивирования. Максимальный рост мицелия был обнаружен на среде со спирогирой.

Наибольшее количество внеклеточного белка продуцировал *T. hirsutus* – 79,8 мг/мл на среде с опилками, что в 4,6 и 8,9 раз выше показателей для *P. ostreatus* и *L. edodes* на той же среде. Самая высокая целлюлазная активность отмечена у *T. hirsutus* (30 МЕ/мг) и, несколько ниже (23 МЕ/мг), у *P. ostreatus* на среде со спирогирой, что, вероятнее всего, объясняется стимулирующим воздействием компонентов клеточной стенки водоросли на синтез целлюлаз.

Высокая активность ферментов лигниназного комплекса отмечена опять же у *T. hirsutus*, но на среде с опилками. Активность лакказы на опилках в 1,6 и 4,5 раз, а для лигнинпероксидазы в 4 раза выше, чем на среде со спирогирой и соломой. Показатели активности лигниназа/лакказа для *P. ostreatus* в 1,5 и 2,3 раза, а для *L. edodes* в 3,2 и 4,9 раз ниже, показателей активности *T. hirsutus*.

Таким образом, по результатам проведенных тестов наиболее высокую активность по отношению к лигноцеллюлозному субстрату показал *T. hirsutus*. Чтобы оценить способность гриба к утилизации субстрата,

было измерено остаточное содержание лигнина и целлюлозы в измельченной древесине после месяца твердофазного культивирования. Доля целлюлозы в обработанном мицелием субстрате снизилась в 2 раза по отношению к исходному субстрату, а доля лигнина – в 1,5 раза. Такое глубокое воздействие продуцента на основные компоненты древесины является важным условием получения биокomпозитов: под воздействием ферментов происходит высвобождение лигнина из целлюлозного матрикса и модификация его структуры. Прессование такого материала при повышенной температуре (баротермическая обработка) способствует прочному связыванию частиц субстрата и грибного мицелия в однородную структуру – биокomпозит.

Для определения оптимальных параметров баротермической обработки проводилась твердофазная ферментация лигноцеллюлозного сырья (смесь опилок лиственных и хвойных пород) в присутствии мицелия *T. hirsutus*. После 14 суток культивирования обросший мицелием по всему объему субстрат высушивался до влажности 10 %. Полученный таким образом продукт представлял собой прямоугольные блоки упругой консистенции и плотностью 175 кг/м^3 , что близко к плотности некоторых теплоизоляционных материалов, используемых в строительстве (минераловата), хотя и заметно выше плотности пенопласта ($15\text{--}50 \text{ кг/м}^3$). Для придания образцу большей твердости и механической прочности проводилось его горячее прессование на гидравлическом прессе. Показано, что оптимальные условия прессования лежат в диапазоне температур $120\text{--}200^\circ\text{C}$, давление $2,5\text{--}5 \text{ Мпа}$, время $10\text{--}20 \text{ мин}$. В этих условиях плотность композита увеличилась до 875 кг/м^3 , что соответствует аналогичному показателю для дерево-стружечных плит, произведенных на основе синтетических связующих ($610\text{--}800 \text{ кг/м}^3$).

Более детальному исследованию физико-механических характеристик полученного образца препятствуют его небольшие размеры ($15\times 15 \text{ см}$), которые лимитируются возможностями пресса и твердофазного культивирования, поэтому на данный момент актуальным является масштабирование всех этапов технологического процесса.

В целом, можно полагать, что состав сырья, подобранные условия культивирования и свойства *T. hirsutus* как продуцента позволят получить древесный биокomпозит с конкурентными эксплуатационными и экономическими характеристиками.

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ
РАЗНООБРАЗИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ
АЭРОЗОЛЕЙ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА**

**BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL
OF DIVERSITY OF MICROORGANISMS
OF AEROSOLS OF ATMOSPHERIC AIR**

Э.П. Прманова

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
Новосибирский государственный медицинский университет, Россия*

E.P. Prmanova

*SRC VB «Vector», Russia
Novosibirsk state medical university, Russia*

Аннотация

Работа посвящена исследованию ферментативной активности микроорганизмов, выделенных из высотных проб аэрозолей атмосферного воздуха. Выявлены высокоактивные штаммы, пригодные для биотехнологических разработок, штаммы, имеющие значение для фундаментальных, таксономических исследований.

Abstract

The work devoted to the study of the enzymatic activity of microorganisms isolated from high – altitude samples of aerosols of atmospheric air. Identified highly active strains, which are suitable for biotechnological development, and strains of important for fundamental and taxonomic researches.

Производство и промышленное применение ферментов микроорганизмов является одной из обширных сфер биотехнологии. Способностью к продуцированию широкого спектра биологически активных веществ обладают представители семейства *Bacillaceae*. Преимущества микробиологи-

ческого метода получения ферментов заключаются в разнообразии их ассортимента, в возможности управления ферментативными системами и составом производимых препаратов, в высокой скорости размножения микроорганизмов и возможности использования доступных и недорогих субстратов. Жизнеспособные микроорганизмы, входящие в состав аэрозолей воздуха, вызывают интерес с точки зрения возможного биотехнологического применения: их разнообразные ферментные системы обеспечивают бактериальным организмам способность противостоять агрессивным факторам среды, таким как, перепады температур, УФ-излучение, низкая влажность среды.. Целью работы являлось определение разнообразия, ферментативной активности спорообразующих бактерий атмосферного воздуха и их возможного биотехнологического применения.

Для отбора проб атмосферных аэрозолей использовали импинджеры, в которые в качестве сорбирующей жидкости заливали 50 мл раствора Хенка (ICN iomedicals). Высотные пробы аэрозолей отбирали с помощью лаборатории «Оптик-Э», смонтированной на базе самолетов АН-30 или ТУ-154. Трасса полета протяженностью 50 км проходила над Караканским бором (правый берег р. Обь, Новосибирская область). В дневное время самолет последовательно пролетал над лесным массивом на высоте 7000, 5500, 4000, 2000, 1500, 1000 и 500 м. Отобранные пробы из импинджеров высевали на селективные питательные среды, позволяющие выявить микроорганизмы, принадлежащие к различным таксономическим группам: жидкую и агаризованную среду LB (Difco, США), обедненную среду LB (разбавление 1:10) с добавлением агара до 1,7 %, крахмало-аммиачный (КАА) и почвенный агар (ПА), среду Сабуро. Высевы инкубировали при температуре 28–30 °С и 6–10°С, в течение 3–14 суток. Индивидуальные колонии бактерий, выросшие на агаризованных средах, использовали для получения чистых культур и последующего их анализа. Морфологию клеток микроорганизмов исследовали методом фазово-контрастной микроскопии с помощью микроскопа Axioskop 40 (Carl Zeiss, Германия). Оптимум pH среды роста определяли при культивировании штаммов на вариантах среды РПА с pH 5,0, 7,0 и 9,0. Температурный диапазон роста определяли при культивировании штаммов на агаризованных средах при температурах 5, 20, 30, 37, 42 и 55°С. Изучение физиологических и биохимических свойств изолятов выполняли стандартными методами.

В результате микробиологического исследования высотных проб атмосферного воздуха в течение октября-декабря 2016 г, получены данные,

включающие численность и состав выделяемых бактерий, дрожжей и грибов. Всего из образцов аэрозолей выделено 225 микробных изолятов, более трети из них согласно микроскопическому исследованию являлись спорообразующими бактериями. При определении физиологических свойств показано, что выделенные культуры бактерий преимущественно являются мезофилами (оптимальный рост при температуре 30 – 42°C). 18 штаммов были способны расти при достаточно широком диапазоне значений pH (5 – 9), семь штаммов – при pH 5 – 7 и 17 штаммов – при значениях pH 7 – 9.

Исследование ферментативной активности микробных изолятов показало, что выраженной протеолитической активностью обладали 19 штаммов. Протеолитические ферменты применяются в медицине, пищевой, кожевенной промышленности, в производстве детергентов. Среди выделенных изолятов были обнаружены 12 штаммов, имеющих амилалитические ферменты (используются в медицине, пищевой, фармацевтической промышленности). Липолитические ферменты обнаружены у 14 штаммов. Липазы широко применяются в производстве для осветления биологических жидкостей, обезжиривания кож, отходов шелкомотального производства. Эффективно применение липаз в составе синтетических моющих средств, высокоочищенные препараты ферментов находят применение в медицине. У 20 штаммов показанов высокое содержание фосфатаз, широко применяемых в молекулярно-биологических исследованиях и в других научных и практических целях. Нуклеазной активностью обладали 4 штамма, что может быть перспективно для разработок противовирусных препаратов. Штаммы Cb-940, Cb-946, Cb-961, Cb-964, Cb-974, Cb-977, Cb-978, Cg-34, Cg-45, Cg-46, Cb 964, Cb 977, Cb 978, выделенные в настоящем исследовании, обладающие высокой узконаправленной или комплексной ферментативной активностью, могут быть рекомендованы для биотехнологического применения и фундаментальных исследований.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ

ELABORATION OF TECHNOLOGY FOR OBTAINING OF PREPARATIONS BASED ON WOOD-BREATHING BASIDIOMYCETES

М.А. Проценко¹, Н.Е. Костина²

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

² ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН, Россия

M.A. Protsenko¹, N.E. Kostina²

¹ SRC VB «Vector», Russia,

² ICG SB RAS, Russia

e-mail: protsenko_ma@vector.nsc.ru

Аннотация

Разработана технология получения препаратов из культивируемого биотехнологическим способом мицелия дереворазрушающих грибов. Выбран оптимальный штамм – *Daedaleopsis tricolor* Db-14 (F-1315). Подобраны состав питательных сред и условия культивирования биомассы мицелия гриба. Получены и охарактеризованы препараты *Daedaleopsis tricolor*.

Abstract

A technology has been developed for obtaining preparations from cultivated mycelia of wood-destroying fungi has been developed. The optimal strain is *Daedaleopsis tricolor* Db-14 (F-1315). The composition of nutrient media and the conditions for cultivation of the biomass of the fungal mycelium have been selected. Preparations of *Daedaleopsis tricolor* have been obtained and characterized.

Дереворазрушающие базидиомицеты – одна из важнейших трофических групп грибов, играющих в лесных экосистемах огромную роль, осуществляя поэтапное разложение лигниноцеллюлозных комплексов древесины, способствуют образованию гумуса, а также трансформируют в цепи

питания через плодовые тела и насекомых-мицетофагов различные микро-элементы.

В последние годы особенно привлекают внимание фармакологов дереворазрушающие базидиомицеты как потенциальные источники для получения новых лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантными, противоопухолевыми, противовирусными свойствами.

Методы биотехнологии позволяют переводить дикие грибы в чистую культуру и выращивать биомассу на основе выделенных штаммов. Мицелиальная биомасса, как сырье для получения лекарственных препаратов, имеет преимущества перед лесными плодовыми телами. Так, обеспечивается экологическая чистота грибных препаратов, независимость от сырьевой базы грибов, появляется возможность влияния на выход и качество конечного продукта, при варьировании условий культивирования и состава питательных сред [1].

Несмотря на то, что высшие базидиомицеты имеют, в целом, более низкую скорость роста на питательных средах по сравнению с бактериями и дрожжами, как объекты биотехнологии они обладают следующими преимуществами:

- способность базидиомицетов синтезировать БАВ, которые не синтезируются или синтезируются в малых количествах дрожжами и бактериями, например, полисахариды (β -глюканы, хитин), пигменты полифенольного ряда (меланины, гуминовые кислоты), тритерпены, сесквитерпены и др.;
- гифальная структура высших грибов, благодаря которой грибы образуют биомассу; при этом исключается стадия тонкой очистки биомассы и облегчается процесс отделения биомассы от питательной среды.

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод, что культивирование высших базидиомицетов для биосинтеза активных метаболитов, таких как полисахариды, белки, фенольные соединения, пигменты, тритерпены, имеет преимущества перед культивированием бактерий, дрожжей и растений.

Дереворазрушающие базидиомицеты актуальны для биотехнологии, так как большинство из них относительно легко выделяются в чистую культуру из природных объектов, характеризуются быстрым ростом и не требуют сложного состава питательных сред для культивирования. [2].

Обязательные этапы при создании технологии получения препаратов на основе культивируемого мицелия дереворазрушающих базидиомицетов:

- 1) выбор и создание продуцента;

2) подбор питательных сред и условий культивирования мицелия гриба;

3) разработку технологии получения экспериментальных образцов препаратов из грибного сырья;

4) характеристика полученных грибных препаратов по содержанию групп биологически активных соединений;

5) тестирование препаратов на биологическую активность *in vitro*;

В качестве продуцента биологически активных веществ выбран вид *Daedaleopsis tricolor* (Bull.) Bondartsev & Singer [3;4]. Штаммы *Daedaleopsis tricolor* Db-14 (F-1315), *Daedaleopsis tricolor* Db-18 (F-1314) и *Daedaleopsis tricolor* Dr-17 (F-1330) выделены в чистую культуру из плодовых тел *Daedaleopsis tricolor*, собранных в 2013 году близ села Выюны Новосибирской области с погибшей березы и в окрестностях поселка Кольцово Новосибирской области с погибшей березы и живой ивы. Штаммы депонированы в коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Наиболее перспективным штаммом для разработки и получения препаратов – штамм *Daedaleopsis tricolor* Db-14

Проведены исследования, определяющие технологию глубинного культивирования высших базидиомицетов. Для выращивания биомассы мицелия грибов выбраны среда с кукурузной мукой и пептоном, среда с крахмалом и кукурузным экстрактом и глюкозопептонная среда. Значение pH используемых сред составляет $6,0 \pm 0,5$. Оптимальные условия культивирования: скорость вращения 190 об./мин, температура 26 ± 2 °C в течение 5-7 суток.

Разработана и оптимизирована технология получения экспериментальных образцов препаратов из ксилотрофного базидиомицетов [5]. Препараты представляют собой этанольные и водные экстракты и спиртонерастворимые полисахаридные фракции.

Полученные образцы препаратов на основе этанольных и водных экстрактов из мицелия штаммов *Daedaleopsis tricolor* охарактеризованы по содержанию суммарного белка, полисахаридов, каротиноидов, фенольных соединений, флавоноидов. Содержание тестируемых групп биологически активных соединений в препаратах на основе мицелия *Daedaleopsis tricolor* варьировало в зависимости от условий выращивания. Например, наблюдалось наивысшее содержание полисахаридов в образцах препаратов, полученных из мицелия, выращенного в среде с глюкозой и соевой мукой.

Тестирование биологической активности показало, что экспериментальные образцы препаратов *Daedaleopsis tricolor* проявляют антиоксидантную активность, противоопухолевый эффект в отношении культу-

ры клеток Нер-2 и противовирусную активность в отношении вируса осповакцины (штамм Л-ИВП) и вируса простого герпеса 2-го типа (штамм MS).

Таким образом, авторами разработана технология получения препаратов из культивируемого биотехнологическим способом мицелия дерево-разрушающих базидиомицетов.

Литература

1. Ковалева Г.К., Громовых Т.И. Биологические свойства и продуктивность нового штамма базидиомицета G.a.-04 *Ganoderma applanatum* (Pers. ex Wallr.) Pal. *Вестник Красноярского Государственного аграрного университета*, 2008, (1), 70–73. (Kovaleva G.K., Gromovykh T.I. Biological properties and productivity of a new Basidiomycete strain. *The Bulletin of Krasnoyarsk state agrarian university*, 2008, (1), 70–73).
2. Киселева О.В., Миронов П.В., Литовка Ю.А. Морфологические особенности базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* в поверхностной и глубоинной культуре. *Вестник Красноярского Государственного аграрного университета*, 2012, (1), 91–95. (Kiseleva O.V., Mironov P.V., Litovka Yu.A. Morphological features of the basidial fungus *Laetiporus sulphureus* in the surface and deep culture. *The Bulletin of Krasnoyarsk state agrarian university*, 2012, (1), 91–95).
3. Kim E., Jung H., Min T. Purification, Structure Determination and Biological Activities of 20(29)-lupen-3-one from *Daedaleopsis tricolor* (Bull. ex Fr.) Bond. et Sing. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2001, 22(1), 59–62.
4. Nianwu H.E. Vitro Activity Study of the Wild *Daedaleopsis Tricolor* Polysaccharide. *Editorial Department of Journal of Shangluo University*, 2012, 1(6), 55–59.
5. Проценко М.А., Трошкова Г.П., Косогова Т.А., Теплякова Т.В. Биологически активные соединения плодовых тел и культивируемого мицелия базидиального гриба *Daedaleopsis tricolor*. *Фундаментальные исследования*, 2014, (12–1), 136–140. (Protsenko M.A., Troshkova G.P., Kosogova T.A., Teplyakova T.V. Biologically active compounds fruiting bodies and mycelium of the basidiomycete *Daedaleopsis tricolor*. *Fundamental research*, 2014, (12–1), 136–140).

**ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА:
ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, БЕЛКОВЫЙ АНАЛИЗ
И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

MILK EXOSOMES:
TECHNOLOGY OF ISOLATION, PROTEIN ANALYSIS,
AND APPLICATION PROSPECTS

Л.В. Пурвинш^{1, 2}, С.Е. Седых^{1, 2}, Г.А. Невинский^{1, 2}

¹ *Новосибирский государственный университет, Россия*

² *Институт химической биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения РАН, Россия*

L.V. Purvinsh^{1, 2}, S.E. Sedykh^{1, 2}, G.A. Nevinsky^{1, 2}

¹ *Novosibirsk State University,, Russia*

² *SB RAS ICBFM, Russia*

e-mail: ladapurvinsh13@gmail.com

Аннотация

Исключительно важной задачей современной медицины является разработка новых неинвазивных способов диагностики и новых подходов для таргетной терапии. Экзосомы являются уникальным источником белков и нуклеиновых кислот, имеющих диагностический потенциал. Исследование экзосом жидкостной биопсии, при которой происходит отбор крови, как биологического материала, имеет широкие перспективы использования для ранней диагностики онкологических заболеваний. Кроме того экзосомы могут быть использованы для адресной доставки лекарственных препаратов в клетки.

Настоящая работа направлена на анализ белковых и нуклеиновых компонентов экзосом молока. Молоко, как сложная биологическая жидкость, является хорошим модельным объектом для разработки технологии выделения экзосом, которая будет эффективна для выделения экзосом из других биологических жидкостей. Изучение белков и нуклеиновых кислот экзосом, исследование возможности «загрузки» различных терапевтически перспективных соединений в экзосомы позволит приблизиться к пониманию биологической роли этих везикул, а также использованию экзосом для диагностики и терапии.

Abstract

An exceptionally important task of modern medicine is the development of new non-invasive methods of diagnosis and new approaches for targeted therapy. Exosomes are the unique source of proteins and nucleic acids with diagnostic potential. The investigation of exosomes for a «liquid biopsy», in which blood like biological material is used, has broad prospects for the early diagnosis of cancer. Also, exosomes can be used for target delivery of drugs into cells.

This work's aim is the analysis of proteins and nucleic components of milk exosomes. Milk like a complex biological fluid is great model subject for development of exosomes isolation technology which will be effective for exosomes obtaining from other biological fluids. The study of exosomal proteins and nucleic acids, loading various therapeutically promising compounds into exosomes will allow us to understand the biological role of these vesicles, as well as the possibility of exosome use for diagnostics and therapy.

Экзосомы – везикулярные структуры размером от 40 до 100 нм, выделяемые клетками в окружающую среду. В последнее время становится все более понятна роль экзосом во внеклеточной коммуникации, показано наличие в них белков, пептидов, ДНК, мРНК и, особенно, микроРНК, была доказана роль нуклеиновых кислот, содержащихся в экзосомах в развитии заболеваний. Кроме того, экзосомы рассматривают в качестве природных векторов для адресной доставки терапевтических нуклеиновых кислот в клетки. В связи с этим, важной и актуальной задачей является разработка нового эффективного метода получения чистых препаратов экзосом, пригодного для выделения из различных биологических жидкостей.

Молоко является исключительно трудным объектом для выделения экзосом, так как концентрация белков в молоке достигает нескольких граммов на литр, что сопоставимо или превышает концентрацию белков в сыворотке/плазме крови. Ранее нами было показано, что использование стандартных подходов выделения экзосом (ультрафильтрация, ультрацентрифугирование) не позволяет получить гомогенные препараты, не содержащие белковых примесей, поэтому нами был разработан подход, который сочетает стандартные протоколы выделения с гель-фильтрацией. По данным просвечивающей электронной микроскопии данная методика позволяет получить гомогенные препараты везикул. Иммуноцитохимическим окрашиванием с использованием антител к основным поверхностным белкам экзосом: CD9, CD81,

CD63 было подтверждено, что полученные везикулы являются экзосомами.

Кроме того, нами были выделены антитела кролика против маркеров экзосом (CD9, CD81, CD63) и использованы для создания колонок для аффинного выделения экзосом. Сочетание разработанного подхода, включающего гель-фильтрацию, и аффинного выделения позволяет получить высокоочищенные препараты экзосом для их дальнейшего анализа.

Анализ белкового состава полученных препаратов показал, что в зависимости от способа выделения экзосом из молока число и соотношение белков в препаратах варьирует. В высокоочищенных препаратах экзосом молока присутствует неожиданно небольшое число белков, что указывает на то, что значительная часть молочных белков не входит в состав экзосом, а совыделяется с ними.

Полученные нами результаты указывают на то, что при правильной технологии выделения молоко может служить перспективным источником экзосом, необходимых для их изучения и разработки на их основе новых диагностических подходов и терапевтических систем доставки лекарственных препаратов.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА А В ПИЩЕВОМ ЯЙЦЕ

THE STUDY OF THE VITAMIN A CONTENT IN THE EGG

И.Р. Ракипова

ФГБОУ ВО Оренбургский государственный университет

I.R. Rakupova

Of the Orenburg State University, Russia

e-mail: irinarakupova@mail.ru

Аннотация

Статья посвящена изучению содержания витамина А в пищевом яйце, реализуемом в торговых точках города Оренбурга. В результате проведенных исследований максимальное количество витамина А обнаружено в перепелиных яйцах.

Abstract

The article is devoted to the study of the vitamin A content in a egg, sold in the outlets of the city of Orenburg. As a result of the studies, the maximum amount of vitamin A was found in quail eggs.

Витамин А и его предшественники – каротиноиды – являются полиненасыщенными соединениями, для которых характерно чередование простых и сопряженных двойных связей. Распространенными природными формами витамина А являются ретинол (витамин А₁) и ретинолпальмитат (рис. 1). Они содержатся в тканях животных организмов. Ретинол (C₂₀H₃₀O) – циклический ненасыщенный одноатомный спирт с пятью двойными связями в молекуле и одним β-иононовым кольцом. У ретинола боковая цепь состоит из 9 атомов углерода с 4 сопряженными двойными связями. Такую цепь можно рассматривать как два остатка изопрена со спиртовой группой. В результате окисления спиртовой группы ретинола образуются ретиноевая кислота и ретиналь, которые также относятся к природным формам витамина А [1].

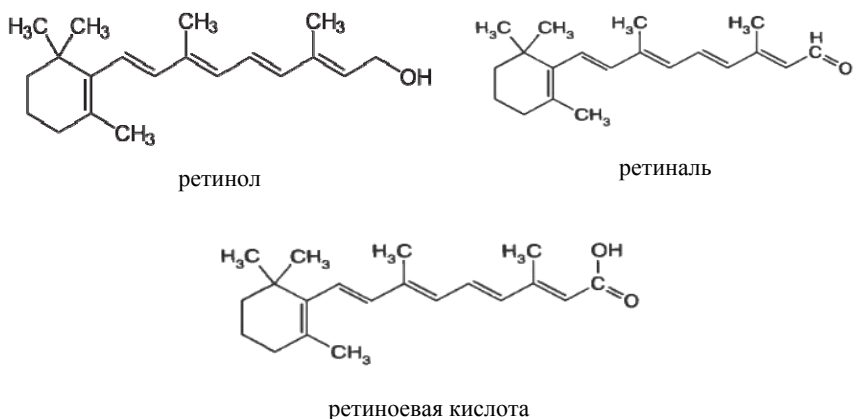
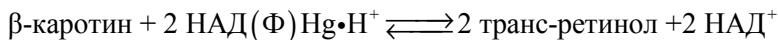


Рис. 1. Структурные формулы природных форм витамина А

Предшественниками витамина А (провитаминами А₁) являются α-, β-, γ-каротины. Каротины, которые содержатся в пище, сами по себе не обладают активностью витамина А, а приобретают её после превращения в ретинол.



Биологическая роль ретинола заключается в регуляции нормального роста, деления и дифференцировки клеток, в синтезе антител, в обеспечении фотохимического акта зрения.

Целью нашего исследования являлось количественное определение содержания витамина А в курином и перепелином яйце, реализуемом в торговых точках города Оренбурга.

Материалы и методы исследования. В качестве объекта исследования были взяты: куриное яйцо яичного кросса Хайсекс Браун (ЗАО «Птицефабрика Оренбургская»); куриное яйцо породы кур Ломанн Вайт (СПК «Птицефабрика Гайская»); куриное яйцо яичного кросса Хайсекс Коричневый (ОАО Спутник); домашнее куриное яйцо породы кур Московская черная; перепелиное яйцо (Андреевское подворье Саракташского района); перепелиное яйцо Сакмарского района.

Содержание витамина А определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Орлант» [3].

Результаты исследования. В норме содержание витамина в пищевом яйце составляет 6-12,5 мкг/г [2]. Согласно проведенным исследованиям, наибольшее содержание витамина А характерно для перепелиных яиц и в

среднем на 40 % выше, чем в курином яйце. Максимальное количество витамина А обнаружено в перепелином яйце Сакмарского района и составляет 13,40 мкг/г (рис. 2).

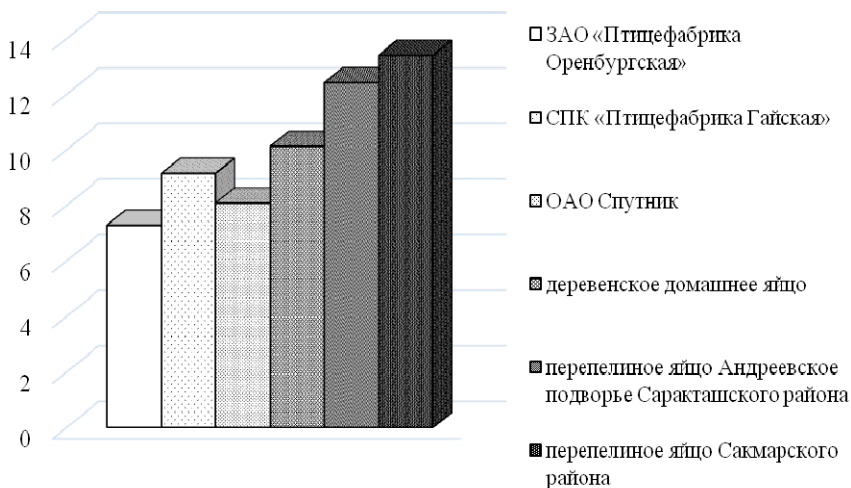


Рис. 2. Содержание витамина А (ретинола) в пищевых яйцах, мкг/г

Таким образом, наибольшее количество витамина А содержится в перепелином яйце. Разное содержание витаминов в пищевом яйце связано с неодинаковым рационом питания и непосредственно с физиологическими процессами в организме птицы.

Литература

1. Березовский В.М. Химия витаминов / В.М. Березовский. М.: Пищевая промышленность, 1973. 632 с.
2. Гапбаров, М.Г. Функциональные продукты питания // Пищевая промышленность. 2003. № 3. С. 6–7.
3. Скурихин В.Н. Методы анализа витаминов А, Е, D и каротина в кормах, биологических объектах и продуктах животноводства: научное издание / В.Н. Скурихин, С.В. Шабает. М. : Химия, 1996. 87 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ ГЕНОВ ВИЧ-ИММУНОГЕНОВ, С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА КОДИРУЕМЫХ БЕЛКОВ И УПРОЩЕНИЯ СХЕМЫ ИХ ОЧИСТКИ

OPTIMIZATION OF HIV-IMMUNOGEN GENES STRUCTURE TO INCREASE BIOSYNTHESIS OF CODED PROTEINS AND SIMPLIFY THEIR CLEANING SCHEME

А.П. Рудометов¹, Д.Н. Щербаков¹, Н.Б. Андреева¹,
А.Ю. Бакулина², А.Н. Чикаев¹, Л.И. Карпенко¹

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

² *Новосибирский государственный университет, Россия*

A.P. Rudometov¹, D.N. Shcherbakov¹, N.B. Andreeva¹,
A.Yu. Bakulina², A.N. Chikaev¹, L.I. Karpenko¹

¹ *SRC VB «Vector», Russia*

² *Novosibirsk State University, Russia*

Аннотация

Особенности структуры рекомбинантных белков оказывают влияние на их биосинтез в клетках-продуцентах и последующую очистку. В данной работе рассмотрено влияние структуры ВИЧ-иммуногенов на их биосинтез в клетках *E. coli*. Приведены результаты анализа влияния замены экспрессионного вектора и штамм-продуцента иммуногена ТВИ. Рассмотрено влияние замены некоторых В-клеточных эпитопов этого белка на эпитопы широконейтрализующих антител, а так же влияние введения полигистидинового олигопептида на его способность к агрегации. Также в работе приведены результаты наработки и очистки химерного белка DNI, состоящего из белка *B. subtilis* YkuJ и участка gp41 MPER ВИЧ-1. Представлены результаты иммуногенности полученных рекомбинантных белков.

Abstract

The features of the structure of recombinant proteins affect their biosynthesis in producer cells and subsequent purification. In this paper, the influence of the structure of HIV-immunogens on their biosynthesis in *E. coli* cells is examined. The results of the analysis of the effect of replacement of the expression vector and the strain of the TBI immunogen producer are presented. The effect of replacing some of the B-cell

epitopes of this protein on epitopes of widely neutralizing antibodies, as well as the effect of the introduction of a polyhistidine oligopeptide on its ability to aggregate, is considered. Also, the results of the development and purification of the chimeric protein DNI, consisting of the *B. subtilis* YkuJ protein and the gp41 site of MPER HIV-1, are presented. The results of immunogenicity of the obtained recombinant proteins are presented.

Общее число носителей ВИЧ-инфекции в мире на данный момент составляет более 36 млн. Россия – одна из стран в мире, где число новых заражений ВИЧ-инфекцией и число смертей, связанных с ВИЧ/СПИД, продолжают возрастать. На 31 декабря 2016 года в России официально зарегистрировано 1114815 ВИЧ-инфицированных людей [<http://www.hivrussia.ru>]. К настоящему времени отсутствуют эффективная вакцина и схемы лечения ВИЧ-инфекции, которые позволили бы элиминировать вирус из организма. Данные обстоятельства говорят о необходимости исследований, направленных на создание эффективного иммуногена.

Целью данной работы является оптимизация структуры нуклеотидной последовательности, кодирующей рекомбинантные белки DNI и TBI, с целью повышения продукции соответствующих белков и упрощения схемы их очистки, а также модификация их аминокислотной последовательности для повышения способности индуцировать наработку нейтрализующих ВИЧ-1 антител.

В качестве первого объекта в работе был использован иммуноген TBI, который включает в себя пять В-клеточных и четыре Т-клеточных эпитопа из белков *env* и *gag* ВИЧ-1. Исходный вариант гена, кодирующего белок TBI встроен в плазмиду pUC19 под контролем индуцируемого промотора *recA* из *P. Mirabelis*. Рекомбинантный полипептид содержит на N-конце дополнительные 20 аминокислот белка *recA*. Очистка белка TBI проводилась из лизата клеток *E. coli* C600 в 8 М мочеvine путем хроматографии на колонках с DE-52 целлюлозой. Выход целевого белка из расчета на общую массу клеток составлял около 15 %. Для оптимизации структуры иммуногена с целью повышения выхода и упрощения процедуры очистки было решено заменить 20 аминокислот белка *recA* на фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB, который состоит из 7 аминокислот. Упрощение очистки рекомбинантного белка достигалось добавлением полигистидинового олигопептида на его C-конец. Также была проведена смена штамма *E. coli* C600 на *E. coli* BL21, и векторной системы pUC19 на pET21a. Оптимизированный вариант TBI был обозначен как oTBI.

Для повышения способности иммуногена индуцировать вирус-нейтрализующие антитела, была проведена дальнейшая модификация белка oTBI. Для этого была проведена замена не нейтрализующих В-клеточные эпитопов, входящих в состав оригинального варианта TBI. В качестве кандидатов на замену были выбраны В-клеточные эпитопы env (255-266), gag (351-361) и gag (99-109). Два из них (env (255-266) и gag (99-109) были заменены на аминокислотные последовательности, представляющие собой эпитопы, с которыми связываются широконейтрализующие антитела (broadly neutralizing antibodies, bnAbs) 10E8 и Z13e1. Вместо gag (351-361) в состав белка TBI был введен линейный пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого антителом VRC01. Все Т-хелперные эпитопы, определяющие альфа-спиральный каркас молекулы, были оставлены без изменений. Модифицированный белок был назван newest TBI (nTBI).

Сравнение уровня экспрессии генов oTBI и nTBI показало, что выход целевых белков увеличился до 30 % от суммы клеточных белков. После очистки и рефолдинга было установлено что, оптимизация структуры TBI, включавшая замену лидерной последовательности и введения 6×His, не повлияла на его растворимость в физиологическом растворе, однако, замена эпитопов частично снизила его растворимость, вследствие чего потребовалась оптимизация протокола рефолдинга. Проведенный вестерн-блот анализ показал, что линейные В-клеточные эпитопы, включенные в состав nTBI, распознаются соответствующими bnAbs.

Очистку иммуногенов проводили с помощью металл-хелатной хроматографии. Степень очистки используемых для иммунизации белков контролировали с помощью электрофореза в 15 % ПААГ. В конечном препарате чистота белка составляла более 98 %.

Для анализа иммуногенности модифицированных белков была проведена иммунизация лабораторных животных очищенным препаратом. Для этого были отобраны 30 мышей линии BALB/c. Мыши были разделены на группы по 10 особей. Две группы были трехкратно иммунизированы внутримышечно белками oTBI и nTBI, по следующей схеме: первая иммунизация – 50 мкг препарата (на одну мышь) с полным адъювантом Фрейнда, вторая иммунизация – 50 мкг препарата с неполным адъювантом Фрейнда, третья иммунизация – 100 мкг чистым белком. Иммунизация проводилась с интервалом 2 недели. Третья группа служила в качестве отрицательного контроля – вводился физиологический раствор, по той же схеме. Все животные содержались в питомнике согласно правилам лабораторной практики и получали должный уход.

Полученные сыворотки лабораторных животных после иммунизации были протестированы в иммуноферментном анализе (ИФА) для оценки

иммуногенности. Было показано, что антитела из сывороток иммунизированных животных специфически взаимодействуют с рекомбинантными белками oTbI и nTbI. Титр сывороток иммунизированных животных в обоих случаях составил более 600 тысяч.

Другим объектом исследования выступал химерный белок DNI, состоящий из белка *B. subtilis* YkuJ, служащим каркасом для молекулы иммуногена, и участка gp41 MPER (membrane-proximal external region) ВИЧ-1, содержащего эпитопы широконейтрализующих антител. При проектировании гена DNI в состав нуклеотидной последовательности были заложены уникальные сайты рестрикции, фланкирующие MPER, для того, чтобы в последующем каждый из участков MPER было возможно заменить на последовательности MPER других субтипов ВИЧ-1. В качестве экспрессионного вектора была выбрана плаزمида pET21a. Ген химерного белка DNI был клонирован в составе плазмидного вектора pET21a в общей рамке считывания с последовательностью полигистидиновой метки (6×His). Это позволило включить в состав рекомбинантного белка DNI аминокислотный фрагмент 6×His, для возможности его очистки при помощи металл-хелатной хроматографии.

Экспрессию гена, кодирующего белок DNI, оценивали с помощью электрофоретического разделения лизата клеток *E. coli* BL21/pDNI в ПААГ. Анализ электрофореграммы показал наличие полосы, по подвижности соответствующей теоретически рассчитанной молекулярной массе белка DNI. Выход химерного белка составил около 10 % от суммарных клеточных белков.

Для подтверждения того, что белок DNI связывается с bnAbs 10E8, был проведен вестерн-блот анализ. Результаты анализа подтвердили, что эпитопы 10E8 в составе белка DNI распознаются bnAbs 10E8. Очистку и анализ иммуногенности химерного белка проводили описанными выше способами. Титр специфических антител сывороток иммунизированных животных в отношении белка DNI составил более 1:600 тысяч.

Таким образом, в ходе данного исследования была проведена оптимизация структуры рекомбинантного иммуногена TbI. Показано, что оптимизация позволила увеличить выход целевого белка без уменьшения растворимости. Замена не нейтрализующих В-клеточных эпитопов в молекуле oTbI на эпитопы широконейтрализующих антител показала отрицательное влияние на растворимость. Был проведен теоретический дизайн химерного белка-иммуногена, на основе белка *B. subtilis* YkuJ, и участка MPER gp41 ВИЧ-1. С помощью иммуноблоттинга было показано, что эпитопы широконейтрализующих антител в составе рекомбинантных белков распознаются соответствующими bnAbs. Показано, что рекомбинантные белки обладают высокой иммуногенностью и способны индуцировать ВИЧ-специфические антитела.

ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОРЕКЦИИ АНТИТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ

MAGNETICALLY CONTROLLED DRUGS AS A PART
OF THERAPY AGAINST ANTITHYROID ANTIBODIES
IN PATIENTS WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS

О.А. Русанова¹, И.П. Гонтарь¹, О.И. Емельянова¹,
Л.А. Маслакова¹, О.В. Парамонова²

¹ *ФГБНУ «НИИ КиЭР им. А.Б. Зборовского», Россия*

² *ФГБОУВО ВолГМУ, Россия*

e-mail: olga-rusanova28@rambler.ru

Аннотация

Имобилизированные гранулированные антигенные препараты на основе тиреоидных гормонов с магнитным свойствами, синтезированные по оригинальной технологии Гонтаря И.П. и соавторов (1990г.) являются высокочувствительными и экономически целесообразными благодаря возможности их регенерации и повторного использования.

Abstract

Immobilized granulated antigen drugs based on thyroid hormones with magnetic properties synthesized using a proprietary process by Gontar et al (1990) are highly sensitive and cost effective thanks to the possibility of their regeneration and reuse.

Введение

Тиреоидные гормоны имеют большое физиологическое значение, которые влияют на все виды обмена веществ в организме, в том числе усиливают как резорбцию, так и синтез костной ткани, влияют на выработку гликозаминогликанов и протеогликанов в соединительной ткани. Избы-

точная выработка антител к гормонам щитовидной железы инициирует инактивацию физиологического действия ферментов и блокирование их активных центров. Клинически проявляется прогрессированием аутоиммунного процесса.

Цель

Разработка и применение способа очистки крови от антител к тиреоидным гормонам с помощью иммобилизованного гранулированного магнитоуправляемого препарата.

Методы

Через, предварительно полученный методом эмульсионной полимеризации в потоке газообразного азота, оригинальный гранулированный магнитоуправляемый препарат с иммобилизованной формой тиреоидного гормона, проведена обработка сыворотки и нативной гепаринизированной крови 10 больных хроническим аутоиммунным тиреоидитом, находившихся на стационарном лечении в ГУЗ городская клиническая больница скорой медицинской помощи № 25 г. Волгоград. Для контроля использовали 10 сывороток здоровых лиц.

В связи с низким молекулярным весом гормонов, мы применили ковалентную сшивку с носителем при помощи глutarового альдегида, имеющего две концевые альдегидные группы (первая из аминок групп фиксируется к акриламиду, вторая к тироксину и трийодтиронину, что создаёт более высокую концентрацию антигена именно на поверхности гранулы. При создании иммобилизованных гранулированных форм химические группы активных центров гормона остаются свободными для связывания с антителами. Определяли содержание иммуноглобулинов к тироксину и трийодтиронину в сыворотке исходно и после перфузии методом преципитации с полиэтиленгликолем. Для проведения сорбции антител из плазмы крови больных в колонку, помещенную в устройство, создающее переменное магнитное поле удерживающие гранулы во взвешенном состоянии вносили гранулы и перфузировали через неё сыворотку и нативную гепаринизированную кровь от больных аутоиммунным тиреоидитом. Далее препарат отмывали и регенерировали. Определяли содержание антител к тироксину и трийодтиронину в сыворотке

В качестве прототипа использовали метод удаления антитиреоидных антител из крови путём пропускания её через иммуносорбент (тиреоидный гормон), активированный бромцианом сепарозы. У указанного способа

есть ряд недостатков: крайне высокая стоимость реактивов, и токсичность, сравнительно меньшая сорбционная ёмкость.

Результаты

Получаемые нами полиакриламидные микрогранулы использовали в качестве сорбента для связывания и удаления антитиреоидных антител из организма у больных с аутоимунными поражениями щитовидной железы. Перфузия через препарат вызывала снижение содержания антител на 99,5 %, однако при помощи прототипа снижение достигалось лишь на 93 % от исходного количества. В процентном соотношении содержание антител до проведения сорбции, как в прототипе, так и в заявляемом образце составило 100 %, однако после перфузии антитела к трийодтирону в заявляемом образце выявлялись в 0,5 % случаев, а в прототипе 7 %; аналогично и антитела к тироксину 0,4 % и 8 %. Данные показатели наглядно демонстрируют преимущество перфузии через гранулы.

Выводы

Таким образом, полученные нами иммобилизированные низкомолекулярные гормоны имеют ряд преимуществ перед прототипом, активированном бромцианом сефарозы, как по ёмкостным характеристикам, так и по отсутствию деструктивного влияния на форменные элементы крови.

**БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ ГРАФТ
НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ
КРОВЕНОСНОГО СОСУДА IN SITU**

**BIOLOGICALLY ACTIVE TISSUE-ENGINEERED GRAFT
BASED ON POLYCAPROLACTONE
FOR BLOOD VESSEL FORMATION IN SITU**

В.В. Севостьянова, Л.В. Антонова, Е.А. Великанова, В.Г. Матвеева,
Е.О. Кривкина, Т.В. Глушкова, А.В. Миронов, Л.С. Барбараш

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний», Россия*

V.V. Sevostyanova, L.V. Antonova, E.A. Velikanova, V.G. Matveeva,
E.O. Krivkina, T.V. Glushkova, A.V. Mironov, L.S. Barbarash

*Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute
for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Russia*

e-mail: sevostyanova.victoria@gmail.com

Аннотация

Тканеинженерный сосудистый графт из поликапролактона с инкорпорированным сосудистым эндотелиальным фактором роста, имплантированный в кровеносное русло, подвергается ремоделированию с привлечением клеток организма и формированием структур кровеносного сосуда.

Abstract

Tissue-engineered polycaprolactone vascular graft with incorporated vascular endothelial growth factor undergoes vascular remodeling due to the homing of host cells and the formation of blood vessel structures after implantation into the circulatory system.

Существующая в настоящее время потребность сердечно-сосудистой хирургии в эффективных сосудистых протезах малого диаметра (< 6мм) для проведения шунтирующих операции, главным образом, обусловлена отсутствием у 30 % пациентов необходимых аутологических вен и артерий в результате уже проведенных операций или атеросклеротического повреждения, а также невозможностью применения для этой цели синтетических сосудистых протезов в результате их низкой проходимости. В связи этим возникает необходимость создания альтернативных сосудистых протезов с высокой степенью проходимости и тромбозоустойчивости. Перспективным направлением в этой области стал подход тканевой инженерии с использованием сосудистых графтов из биodeградируемых полимеров для привлечения клеток организма и регенерации на его основе сосудистой ткани в месте имплантации. В связи с этим был разработан сосудистый графт на основе биodeградируемого полимера поликапролактона (poly(ϵ -caprolactone), PCL), модифицированный молекулами сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF). Целью данной работы явилась оценка формирования структур стенки кровеносного сосуда на основе имплантированного в кровеносное русло биodeградируемого графта с инкорпорированным VEGF.

Материалы и методы

Сосудистые графты ($\varnothing=2$ мм) изготавливали на установке электроспиннинга Nanon-01A (MECC, Япония) из 14 % раствора поликапролактона (Sigma–Aldrich) в хлороформе при следующих условиях: напряжение – 15 кВ, скорость подачи раствора – 0,5 мл/ч, расстоянии до коллектора – 150 мм, игла – 22G, коллектор – штифт ($\varnothing=2$ мм). Для изготовления графтов, содержащих биомолекулы, раствор рекомбинантного VEGF крысы (Sigma–Aldrich) в фосфатно-солевом буфере (Invitrogen) в концентрации 10 мкг/мл смешивали с 14 % раствором PCL в соотношении 1:20 до получения эмульсии с последующим проведением электроспиннинга при 18 кВ и остальных условиях как для PCL графтов. Морфологию графтов PCL и PCL/VEGF изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа HitachiS-3400N (Hitachi). Размер волокон, пор и пористость материала определяли по полученным изображениям с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health). Графты PCL и PCL/VEGF имплантировали самцам крыс популяции Wistar массой 400-450 г ($n=24$) в брюшную часть аорты ниже почечной артерии и выше уровня бифуркации с использовани-

ем шовного материала 8-0. Крыс с PCL и PCL/VEGF графтами выводили из эксперимента через 1, 3 и 6 месяцев ($n=4$ в каждой группе). Графты выделяли с участками прилежащей аорты и оценивали гистологически с окраской гематоксилин и эозин на микроскопе AXIO Imager A1 (Carl Zeiss), а также иммунофлуоресцентным анализом к CD31, CD34, фактору фон Виллебранда (vWF), коллагену I и IV типа на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 700 (Carl Zeiss). Для статистического анализа полученных данных использовали GraphPad Prism (GraphPad Software) с определением нормальности распределения критерием Колмогорова-Смирнова и достоверности различий критерием Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$. Данные представлены как медиана и 25-ый и 75-ый процентиля – Me (25 %; 75 %).

Результаты

Результаты определения морфологии PCL и PCL/VEGF графтов показали, что введение VEGF приводило к достоверному снижению среднего диаметра волокна до 1,50 (1,31; 1,88) мкм и площади пор до 6,09 (1,75; 19,9) мкм² относительно немодифицированных образцов, для которых данные параметры составили 1,88 (1,69; 2,26) мкм и 13,37 (3,75; 35,54) мкм² соответственно. При этом оба вида графтов имели высокопористую структуру и не отличались по проценту пористости, которая составила 49 % для PCL и 50 % для PCL/VEGF.

Оценка влияния биологических эффектов VEGF на проходимость графтов и формирование сосудистой стенки на экспериментальной модели с протезированием брюшной аорты крысы продемонстрировала лучшую проходимость графтов PCL/VEGF (75 %) через один месяц имплантации по сравнению с немодифицированными образцами (50 %), и через 6 месяцев 100 % и 75 % соответственно. Непроходимость графтов была обусловлена тромбообразованием в зоне анастомоза.

Иммунофлуоресцентное исследование эксплантированных образцов показало, что в проходимых PCL/VEGF графтах на внутренней поверхности имплантатов присутствовало большое количество незрелых эндотелиальных клеток с фенотипом CD31+CD34+ уже через 1 месяц имплантации. При этом на немодифицированных образцах наблюдали только отдельные транзиторные эндотелиальные клетки CD31+CD34+. После 3 месяцев имплантации просвет PCL/VEGF графтов был выстлан CD31+CD34+ клетками с появлением зрелых эндотелиальных клеток (CD31+CD34-), которые через 6 месяцев формировали монослой эндотелия с небольшим присутст-

вием незрелых клеток. При этом в PCL графтах после 3 месяцев имплантации на внутренней поверхности наблюдали появление зрелых эндотелиальных клеток (CD31+CD34-), однако через 6 месяцев не отмечали формирования эндотелиального монослоя. Во всех графтах со свободным просветом на внутренней поверхности определяли vWF-позитивный слой, что может свидетельствовать о функциональной активности эндотелиальных клеток.

Результаты флуоресцентного окрашивания на ядра клеток (DAPI) и коллагены I и IV показали высокую клеточность стенки графтов PCL и PCL/VEGF после 1 месяца имплантации. Кроме того, коллаген IV типа формировал слой на внутренней поверхности, также присутствовал в стенке обоих видов графтов. Коллаген I типа наблюдали только на внешней поверхности стенки. Различий по количеству и расположению клеток и коллагена между группами PCL и PCL/VEGF не было отмечено во всех временных точках.

Выводы

VEGF, инкорпорированный в PCL графты, стимулировал эндотелизацию их внутренней поверхности, тем самым, способствуя высокой проходимости. Кроме того, при функционировании в кровеносном русле PCL/VEGF графты подвергались ремоделированию с формированием структурных компонентов, характерных для сосудистой стенки.

Таким образом, доставка биомолекул в место регенерации в составе биodeградируемых сосудистых графтов способствует ускорению эндотелизации и сохранению проходимости имплантатов, а их структура обеспечивает благоприятные условия для формирования стенки тканеинженерного кровеносного сосуда *in situ*.

ВЛИЯНИЕ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ CAS9-RNF169 И CAS9-CTIP НА CAS9 ИНДУЦИРОВАННУЮ РЕПАРАЦИЮ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК*

EFFECT OF CAS9-RNF169 AND CAS9-CTIP CHIMERIC PROTEINS
ON CAS9 INDUCED DOUBLE-STRAND BREAK DNA REPAIR

С.С. Скрипкин¹, А.М. Юнусова², А.В. Смирнов², Н.Р. Баттулин^{1,2}

¹ *ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет», Россия*
² *ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия*

S.S. Skripkin¹, A.M. Yunusova², A.V. Smirnov², N.R. Battulin^{1,2}

¹ *Novosibirsk State University, Russia*
² *Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Russia*

Аннотация

Увеличение частоты репарации двунитевых разрывов, индуцированных CRISPR/Cas9, по пути гомологичной рекомбинации, возможно путем присоединения к Cas9 белковых доменов от факторов, позитивно регулирующих гомологичную рекомбинацию. В качестве белков для модификации Cas9 были использованы RBBP8 (CtIP) и RNF169.

Abstract

An increase in the frequency of repair of double-strand breaks induced by CRISPR/Cas9 along the path of homologous recombination is possible by attaching protein domains to Cas9 from factors that positively regulate homologous recombination. As proteins for the modification of Cas9, RBBP8 (CtIP) and RNF169 were used.

Система редактирования генома CRISPR/Cas9 применяется во многих лабораториях мира, в частности, для генной терапии в клетках человека и получения трансгенных животных. Для данных целей важно добиться высокой частоты гомологичной рекомбинации при встройке трансгенов или

* Работа выполнена при поддержке РФФ, проект 16-14-00095.

при замене целевых участков в геноме. Известно, что процесс репарации ДНК обеспечивается двумя конкурирующими путями репарации – негомологичным соединением концов (НСК) с образованием индел-мутаций или гомологичной рекомбинацией. Исследователи используют разные способы повышения частоты гомологичной рекомбинации: ингибиторы белков НСК, синхронизация клеток в G1-фазе и другие.

Для повышения эффективности трансгеноза были задействованы каталитические и организующие белок-белковые взаимодействия домены факторов RNF169 и CtIP (RBBP8), являющихся важными элементами в устранении двунитевых разрывов ДНК по пути гомологичной рекомбинации.

Целью данного исследования является получение химерных белков Cas9-RNF169 и Cas9-CtIP и изучение их влияния на Cas9 индуцированную репарацию двунитевых разрывов ДНК.

Для оценки эффективности гомологичной рекомбинации была получена линия клеток эмбриональной почки человека HEK293, несущая встройку генетической конструкции Traffic-Light Reporter (TLR), имеющей 2 поврежденных гена флюоресцентных белков – Venus и RFP, а также сайт узнавания и внесения разрыва для Cas9. Полученный разрыв может быть восстановлен по пути негомологичной сшивки концов, приводящей к сдвигу рамки считывания и экспрессии RFP, или по пути гомологичной рекомбинации, с использованием донорного вектора Venus, что инициирует восстановление гена и продуцирование полнофункционального продукта. По типу флюоресценции возможно определить каким способом произошло восстановление Cas9-опосредованного двунитевого разрыва.

Для эксперимента были сконструированы плазмиды, кодирующие химерные белки Cas9-CtIP и Cas9-RNF169, плазмиды, кодирующие РНК гиды к целевым участкам для внесения разрыва TLR-конструкции, а также донорная плазида Venus, являющаяся матрицей для рекомбинации с репортерной конструкцией TLR.

Полученная линия клеток HEK293 со встройкой репортерной конструкции TLR была подвергнута трансфекции собранными плазмидными векторами. Оценка влияния белковых доменов на частоту гомологичной рекомбинации была произведена при помощи проточной цитофлуориметрии.

В ходе исследования было установлено, что химерные белки Cas9-CtIP и Cas9-RNF169 не оказывают существенного влияния на частоту репарации двухцепочечных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации. Частота гомологичной рекомбинации для контроля с исходным Cas9 составила 18,1 %, для Cas9-CtIP – 16,4 %, для Cas9-RNF169 – 18,9 %.

**СИНТЕЗ НОВЫХ «ЦВИТТЕРИОННЫХ»
ПЕНТАМЕТИНОВЫХ ИНДОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ
С РАЗЛИЧНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ ***

SYNTHETIC ROUTE TO NOVEL ZWITTERIONIC
PENTAMETHINE INDOCYANINE FLUOROPHORES
WITH VARIOUS SUBSTITUTIONS

М.А. Спицын, В.Е. Кузнецова, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Россия*

M.A. Spitsyn, V.E. Kuznetsova, R.A. Miftakhov, A.V. Chudinov

*Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Russia*

Аннотация

Нами синтезированы и охарактеризованы два ряда новых электронейтральных водорастворимых пентаметиновых цианиновых красителей с геометрически сбалансированной структурой. Первый ряд цианиновых красителей – это «цвиттерсионные» флуорофоры, содержащие положительно заряженный триметиламмоний-алкильный заместитель и отрицательно заряженную сульфо группу. Второй ряд – цианиновые красители, содержащие сульфо группу на одном индолениновом фрагменте и карбоксильную группу на другом, присоединенную через *N*-ацилсульфамидную связь. На основе всех красителей получены дезоксиуридин-трифосфаты и проведена оценка их использования в качестве реагентов для маркирования нуклеиновых кислот в ходе ПЦР с использованием *Taq* ДНК-полимеразы. Проведено исследование эффективности регистрации маркированных нуклеотидов в «Real-time» ПЦР и при помощи коммерческой тест-системы «KRAS-Biochip».

Abstract

Two series of novel electroneutral water-soluble pentamethine cyanine dyes with geometrically-balanced structure were synthesized and characterized. One series of cyanine dyes is the «zwitterionic» fluorophores, containing positively charged trimethylammonioalkyl and negatively charged sulfonate groups. Second series of cyanine dyes con-

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-14-01090-П.

tain a sulfonate group on the one indolenine nucleus and carboxyl group linked through an *N*-acylsulfonamide bond on the other indolenine nucleus. The dye-modified deoxyuridine triphosphates have been synthesized and evaluated as reagents for nucleic acid labeling in PCR with Taq DNA-polymerase. The efficiency of incorporation of labeled nucleotides was investigated in Real-time PCR and through the use of «KRAS-Biochip» commercial test system.

Цианиновые красители являются предметом постоянного интереса научного сообщества из-за относительной легкости методов их синтеза, возможности регулирования спектров поглощения и флуоресценции, высоких значений коэффициента молярной экстинкции и квантового выхода флуоресценции. Это в значительной мере позволяет уменьшить фоновые сигналы и увеличить сигналы регистрации.

Целью данного исследования явился синтез электронейтральных цианиновых красителей с повышенной водорастворимостью и улучшенными спектральными характеристиками по сравнению с традиционными моносульфированными цианиновыми красителями. Нами синтезированы два ряда цианиновых красителей: флуорофоры, содержащие две сульфо группы и одну кватернизованную аммонийную, и флуорофоры, содержащие одну сульфо группу и одну *N*-ацилсульфомидильную группу.

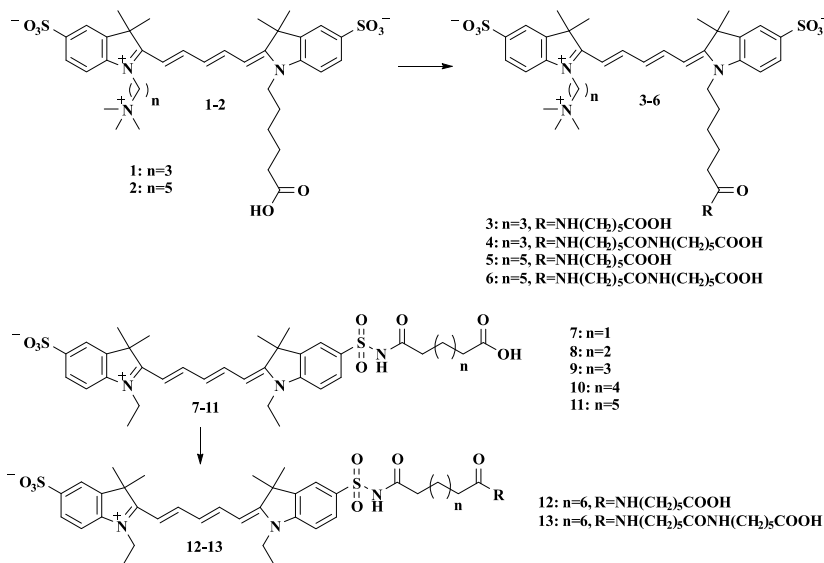


Рис. 1. Структуры синтезированных цианиновых красителей

Для всех полученных красителей записаны спектры поглощения и флуоресценции, измерены коэффициент молярной экстинкции и квантовый выход флуоресценции.

Нами осуществлен синтез конъюгатов красителей с дезоксинуклеозидтрифосфатом, а также проведены их испытания в качестве субстратов для *Taq* ДНК-полимеразы в ПЦР, а соответствующие флуоресцентно-меченные ДНК проверены в гибридизационном анализе на биочипах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что цианиновые красители представляют собой перспективный класс флуорофоров для высокоэффективного маркирования нуклеиновых кислот.

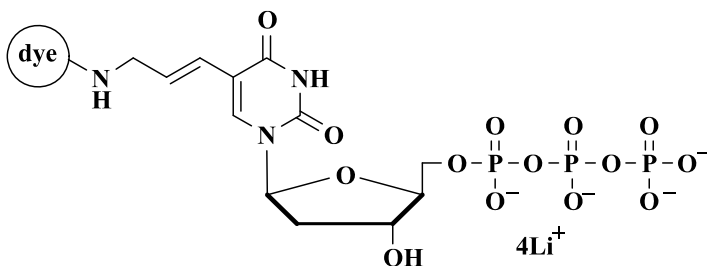


Рис. 2. Структура конъюгата краситель-dNTP

В ходе проведения работы выявлено, что конъюгаты нуклеотидов, содержащих цвиттерионные цианиновые красители со средней длиной линкера, являются более эффективными субстратами для *Taq* ДНК-полимеразы при маркировании ДНК в ходе ПЦР.

**ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА
АСТАКСАНТИНА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PHAFFIA RHODOZYMA*
(*XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*)**

**OBTAINING A HIGH-EFFECTIVE ASTAXANTIN PRODUCT
BASED ON YEAST *PHAFFIA RHODOZYMA*
(*XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*)**

К.В. Старожилова, Е.А. Колосова, Д.Н. Щербаков

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

K.V. Starozhilova, Ye.A. Kolosova, D.N. Shcherbakov

SRC VB «Vector», Russia

e-mail: ksenka0611@mail.ru

Аннотация

На практике был применен новый метод увеличения количества астаксантина. Был проведен эксперимент на дрожжах *Phaffia rhodozyma* с помощью УФ- и гамма-излучения. Подтверждено увеличение количества каротиноида, на основе углубления окраски дрожжей *Phaffia rhodozyma*.

Abstract

In practice, a new method was used to increase the amount of astaxanthin. An experiment was conducted on the yeast of *Phaffia rhodozyma* with the help of UV and gamma radiation. An increase in the amount of carotenoid was confirmed by deepening the color of the yeast *Phaffia rhodozyma*.

Одной из главных проблем сельскохозяйственных предприятий является обеспечение полноценного питания животных и поддержания в норме пищеварительных процессов. Современные промышленные технологии животноводства неизбежно вызывают у животных состояние стресса – систему адаптационных реакций организма, требующих дополнительных затрат энергии, а также ограничивают контакт животных с естественными донорами нормальной микрофлоры кишечника (почвой, водой, растениями).

В дополнение, в процессе заготовки корма теряют часть своих питательных свойств.

Одним из основных показателей качества рациона животного является содержание витамина А или его предшественников – каротиноидов. Витамин А принимает активное участие в важнейших процессах обмена веществ, происходящих в клетках и тканях животных. Дефицит витамина А порождает многочисленные симптомы недостаточности, особенно в период эмбрионального развития животных (1).

Астаксантин – это высший каротиноид, представляющий собой 3,3'-дигидроксилированное и 4,4'-дикетилированное производное β-каротина (3,3'-дигидрокси-, β'-каротин-4,4'-дион) (рис. 1).

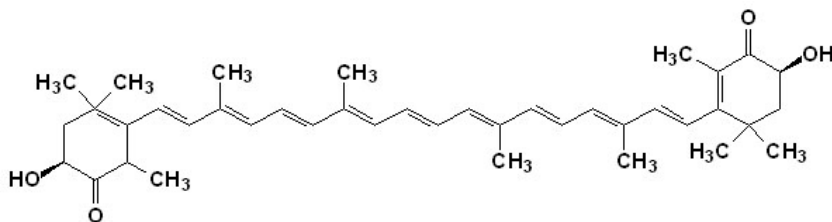


Рис. 1. Структурная формула астаксантина

Из-за двух хиральных центров в углероде 3 и 3' в каждом ионовом кольце, астаксантин может существовать в трех различных стереоизомерах: (3S, 3'S), (3R, 3'R) (энантиомеры) и (3R, 3'S) (мезо-форма).

Использование культуры *Phaffia rhodozyma* позволяет получать астаксантин в (3R, 3'R) конфигурации, являясь единственным известным естественным источником для этого стереоизомера. Астаксантин формируется в виде различных геометрических изомеров с цис- и транс-двойными связями в полиеновой цепи. *Phaffia rhodozyma* синтезируют, в основном, транс-изомер, но также в существенных количествах могут быть найдены 9- и 13-цис-изомеры. Эти изомерные формы слегка отличаются по их оптическому спектру (2). Таким образом, использование *Phaffia rhodozyma* позволяет получать астаксантин в форме легко усвояемой животными. Таким образом, нашей целью стало получение суперпродуцента астаксантина.

В работе использовали штамм *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) Y2238 из коллекции ВКПМ. Мутагенез осуществляли при помощи УФ облучения и гамма-облучения (ускоритель ядерных частиц). Для отбора мутантов, способных к сверхсинтезу астаксантина на чашку с агаризованной средой А высевали разведения подорошенной культуры *Phaffia rhodozyma* из расчета 10-20 колоний на чашку. Далее чашки подвергали УФ облучению в течении 1 часа – 14 часов. Далее чашки помеща-

ли в термостат (20 °C) и культивировали в течение 4 сут. Затем отбирали единичные колонии с яркой красной окраской. Процедуру повторяли несколько раз. Для качественного определения астаксантина проводили экстракцию биомассы этиловым спиртом. Для определения наличия астаксантина использовали систему для высокоэффективной жидкостной хроматографии 1260 Infinity с гибридным квадрупольно-времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения Accurate Mass Q-TOF 6530 Agilent Technologies. В качестве стандарта использовали коммерчески доступный образец астаксантина (SML0982-50MG). Известно, что для поддержания постоянного уровня синтеза астаксантина в природных изолятах *Phaffia rhodozyma* требуется постоянное облучение видимым или УФ облучением. Поэтому было решено проводить мутагенез в условиях высоких доз УФ облучения, а так же гамма-облучением, для закрепления синтеза этого каротиноида. Было подобрано наилучшее время облучения УФ (9 часов) и гамма-облучения (10мА/15 сек.). После первых циклов мутагенеза, отличий в морфологии и окраске колоний не наблюдалось. Однако после пяти пассажей визуально наблюдалось углубление окраски, смещение ее с оранжевой окраски в сторону красной. Кроме того, эффект гамма-облучения был так же замечен на скорости роста штамма. Анализ экстрактов биомассы дрожжей при помощи жидкостной хроматографии показал наличие этого каротиноида.

Известно, что для поддержания постоянного уровня синтеза астаксантина в природных изолятах *Phaffia rhodozyma* требуется постоянное облучение видимым или УФ облучением. Поэтому было решено проводить мутагенез в условиях высоких доз УФ облучения, а так же гамма-облучением, для закрепления синтеза этого каротиноида. Было подобрано наилучшее время облучения УФ (9 часов) и гамма-облучения (10мА/15 сек.). После первых циклов мутагенеза, отличий в морфологии и окраске колоний не наблюдалось. Однако после пяти пассажей визуально наблюдалось углубление окраски, смещение ее с оранжевой окраски в сторону красной. Кроме того, эффект гамма-облучения был так же замечен на скорости роста штамма. Анализ экстрактов биомассы дрожжей при помощи жидкостной хроматографии показал наличие этого каротиноида.

Литература

1. Степурин Г.Ф., Вранчан В.Г. Питание и кормление животных. Государственный Аграрный Университет Молдовы.-Кишинэу 2008.400 с.
2. Schmidt I. Schewe, H., Gassel, S., Jin, C., Buckingham, J., Hümbelin, M., Sandmann G., Schrader, J. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma*/ *Xanthophyllomyces dendrorhous* // Applied microbiology and biotechnology. 2011. Т. 89. № 3. С. 555–571.

**СРАВНЕНИЕ ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ
СЕМЕЙСТВА ПОДРОЖНИКОВЫЕ**

**COMPARISON OF THE RECONSTRUCTIVE ACTIVITY
OF DIFFERENT TYPES OF FAMILY PLANTS**

И.Ю. Уткина

ФГБОУ ВО Оренбургский государственный университет, Россия

I.Y. Utkina

Orenburg State University, Russia

e-mail: aniri.2010@mail.ru

Аннотация

Растения семейства Подорожниковые (*Plantago*) содержат биофлавоноиды, которые ингибируют перекисное окисление липидов за счет восстановления радикалов. В ходе исследования мы сравнили восстанавливающую активность подорожников различных видов.

Abstract

Plants of the Plantain family contain bioflavonoids, which inhibit lipid peroxidation due to the reduction of radicals. In the course of the study, we compared the restoring activity of plantains of various species.

Реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) являются свободнорадикальными и постоянно происходят в организме. Свободнорадикальное окисление нарушает структуру многих молекул: ДНК, белков и различные мембранные структуры клеток. Для ингибирования процессов ПОЛ используют вещества с высокой восстанавливающей активностью [1]. С этой целью используют растения семейства Подорожниковые (*Plantago*) Восстанавливающая активность, предположительно, обусловлена содержанием в растениях биофлавоноидов – большой группы соединений с полифенольной структурой. Одной из самых важных особенностей строения биофлавоноидов является количество и активность гидроксильных групп, способных к комплексообраз-

зованию, благодаря которым молекула может служить ловушкой для свободных радикалов, ионов металлов переменной валентности, таким образом, инигируется процесс ПОЛ [3].

В связи с этим целью нашей работы явилось проведение сравнительного анализа восстанавливающего действия различных представителей растений рода Подорожники. Для исследования использовались листья подорожника наибольшего (*P. maxima*), подорожника ланцетовидного (*P. lanceolata*), подорожника большого (*P. major*), собранные в период цветения в пойме р. Урал (Оренбургская область). Водные экстракты данных растений изготавливались путем кипячения сырья в дистиллированной воде в течение 30 минут. Были использованы экстракты, произведенные из сырья в разведениях 1/10, 1/20 и 1/30. Восстанавливающая активность измерялась на восстановление FeCl_3 [2]. В качестве стандарта восстанавливающего действия использовалась аскорбиновая кислота (1мМ). В связи с этим, результаты восстанавливающей активности для экстрактов растений выражались в эквивалентах аскорбата. Измерения были проведены на спектрофотометре Apel (Япония). Результаты исследований представлены в виде средних арифметических значений показателей и соответствующих им величин среднеквадратических отклонений.

В ходе работы было установлено, что восстанавливающая активность *P. maxima* и *P. lanceolata* при разведении экстрактов 1/10 превысила показатель *P. major* ($8,75 \pm 0,86$ экв. аск.) в 1,86 и в 1,96 раза соответственно. При разведении сырья до 1/20 показатель восстанавливающей активности *P. maxima* и *P. lanceolata* был выше показателя *P. major* ($6,23 \pm 1,03$ экв. аск.) в 1,38 и в 1,49 раза соответственно, данная тенденция сохраняется и для меньшей концентрации экстрактов. При концентрации 1/30 восстанавливающая активность *P. maxima* в 1,26 раза выше, а *P. lanceolata* в 1,59 раза выше, чем восстанавливающая активность *P. major* ($4,46 \pm 0,39$ экв. аск.).

Таким образом, результаты данного исследования показали, что наиболее высокие показатели восстанавливающей активности были определены у *P. lanceolata*. Следует отметить, что фармакопейный *P. major* в различных концентрациях уступает по этим параметрам *P. maxima* и *P. lanceolata*, что необходимо учитывать при использовании разновидностей подорожников в фитотерапии.

Литература

1. Алейникова Т.Л., Биохимия: учебник для вузов / М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. 779 с.
2. Oyaizu M., Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japanese Journal of Nutrition, 1986, 44, 307–315
3. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс: антиоксиданты и прооксиданты. М.: Фирма «Слово», 2006, 556 с.

**ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ЭЛЮЦИИ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА
ИЗ ГЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
*GLUCONOACETOBACTER XYLINUM***

**A STUDY OF THE DYNAMICS OF HUMAN ALBUMIN ELUTION
FROM THE BACTERIAL CELLULOSE GEL
OF *GLUCONOACETOBACTER XYLINUM***

А.В. Харченко¹, Н. Широкова²

¹ *ФБУН Новосибирский исследовательский
институт травматологии и ортопедии, Россия*
² *Новосибирский государственный университет, Россия*

A.V. Harchenko¹, N. Shirokova²

Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Russia
Novosibirsk State University, Russia

Аннотация

Имплантация гелей бактериальной наноцеллюлозы *G.xylinum* в организм человека неизбежно сопровождается диффузией белков из крови и тканевой жидкости. Изучение скорости элюции альбумина из геля бактериальной целлюлозы свидетельствует, что циркуляция альбумина человека происходит в течение 2,5 часов, это позволяет прогнозировать быстрое перераспределение белков, со сходными характеристиками, в имплантате на основе бактериальной целлюлозы.

Abstract

Implantation of gels bacterial nanocellulose *G.xylinum* in the human body is inevitably accompanied by diffusion of proteins from the blood and tissue fluid. A study of the rate of elution of albumin from the bacterial cellulose gel was indicates that the circulation of human albumin occurs within 2.5 hours, this allows predicting a rapid redistribution of proteins with similar characteristics in a bacterial cellulose-based implant.

Имплантация гелей бактериальной наноцеллюлозы в организм человека неизбежно сопровождается диффузией белков из крови и тканевой жидкости. Альбумин является одними из мажорных белков протеома человека и животных, поэтому динамика распределения этого белка в геле целлюлозы представляет практический интерес.

Цель исследования

Изучение динамики диффузии белков, на модели альбумина человека в геле целлюлозы *G. xylinum*

Материалы и методы

Образцы бактериальной целлюлозы, очищенной от посторонних примесей, были предоставлены сотрудниками ИХБФМ СО РАН (лаборатория фармакогеномики).

Концентрацию альбумина определяли с использованием стандартного теста с бромкрезоловым зеленым. Оптическую плотность проб измеряли на планшетном спектрофотометре Tecan Sunrise. Обработку полученных данных осуществляли методом сплайн-интерполяции с использованием программного обеспечения RidaSoft (R-Bofarm). Все эксперименты проводили в пяти повторностях.

Результаты собственных исследований

Схема эксперимента была следующей:

Кусочки бактериальной целлюлозы толщиной ~3 мм и площадью 1 см. пропитывали в 10 % растворе альбумина при температуре +5 °С в течение суток. После чего помещали целлюлозу в 1 мл 0,01М фосфатно-солевого буфера pH7,2 и с интервалом 30 минут определяли содержание альбумина.

Как следует из рис. 1 большая часть альбумина выводилась из геля целлюлозы в течение 1,5 часов, в соответствии с логарифмической функцией.

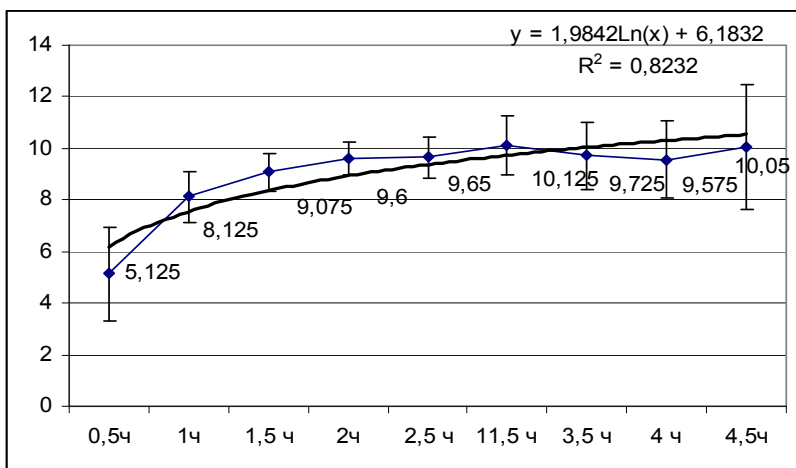


Рис. 1. Динамика элюции альбумина из геля целлюлозы, мг/мл (M+SD)

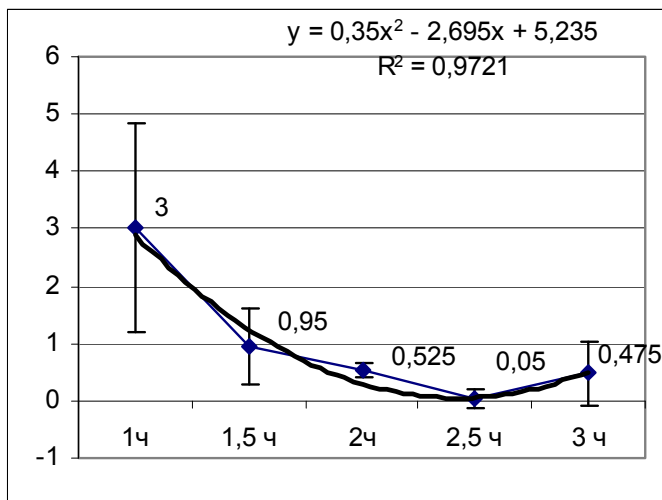


Рис. 2. Динамика снижения количества элюируемого из геля целлюлозы альбумина

На основе анализа кривой второго порядка также видно быстрое снижение количества, элюируемого из кусочков геля, альбумина, что может быть объяснено быстрым истощением депо альбумина сформировавшегося в геле (рис. 2). Через 2,5ч концентрация альбумина элюируемого из целлюлозы снижается до недетектируемых значений.

Закключение

Циркуляция альбумина человека в геле бактериальной целлюлозы *G.xylinum* происходит в течение 2,5 часов, что позволяет прогнозировать быстрое перераспределение белков, со сходными характеристиками, в имплантате на основе бактериальной целлюлозы.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ЗИКА И ИХ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ

OBTAINING THE PRODUCERS OF CHEMICAL PROTEINS OF VIRUS ZIKA AND THEIR CHARACTERIZATION

Д.В. Шаншин¹, А.Ю. Бакулина², Д.Н. Щербаков¹

¹ *ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Новосибирск, Россия;*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*

D.V. Shanshin¹, A.U. Bakulina², D.N. Scherbakov¹

¹ *SRC VB «Vector», Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

e-mail: shanshin_dv@vector.ru

Аннотация

По данным ВОЗ случаи заражения вирусом Зика зарегистрированы в 72 странах, из них в 55 странах начиная с 2015 г. Вирус Зика может переноситься различными видами комаров *Aedes*, в настоящее время считается, что основным переносчиком вируса Зика является *Aedes aegypti*. Данный вид комаров помимо вируса Зика переносит, вирус Денге и Чикунгунья. На современном этапе методы серологической диагностики не позволяют уверенно дифференцировать виды флавивирусов. При помощи биоинформатического анализа белковых последовательностей представителей *Flaviviridae* были найдены фрагменты имеющие потенциал использования в качестве антигенов для диагностики. Найденные фрагменты были охарактеризованы в ИФА.

Abstract

According to the WHO, cases of Zike virus infection have been registered in 72 countries, of which in 55 countries since 2015. The virus of Zika can be transferred by different types of *Aedes* mosquitoes, it is now believed that the main carrier of the Zick virus is *Aedes aegypti*. In addition to the virus, Zika suffers from this type of mosquitoes, the virus Dengue and Chikungunya. Modern methods of serological diagnosis do not

allow to clearly differentiate the flavivirus species. With the help of bioinformatic analysis of protein sequences of representatives of Flaviviridae, fragments with the potential for use as antigens for diagnosis were found. The fragments found were characterized in ELISA.

Flaviviridae является семейством вирусных патогенов, которые могут вызывать тяжелые заболевания и смерть, как у животных так и у людей. К роду флавивирусов относятся более 70 вирусов такие как вирус Денге, вирус Западного Нила (ВЗН), вирус желтой лихорадки (ВЖЛ), вирус Зика и другие. Все флавивирусы объединяет трансмиссивный путь передачи. Течение различных заболеваний вызванных представителями рода флавивирусов варьируется от легкой лихорадки и недомогания, до фатального энцефалита или геморрагической лихорадки.

Вирус Зика является арбовирусом, принадлежащим к семейству флавивирусов, в основном передающийся человеку через укус *Aedes mosquitos*. Впервые вирус Зика был выделен у макаки в лесу Зика в Уганде в 1947 году, в дальнейшем был обнаружен у комаров и у людей. До недавних времени вирус Зика не рассматривался как опасный патоген, так как лихорадка Зика протекала бессимптомно, или ее симптомы были схожи с лихорадкой Денге. Вспышки лихорадки Зика были в основном в Африке и Юго-Восточной Азии, и эпидемическая активность не наблюдалась. Однако в последние 5 лет произошла активизация патогенна, крупная вспышка наблюдались на острове Яп в западной части Тихого океана в 2007 году, и, уже в 2015 году вирус достиг Бразилии, откуда он быстро распространился на другие южноамериканские страны.

Вирус Зика может переноситься различными видами комаров *Aedes*, в настоящее время считается, что основным переносчиком вируса Зика является *Aedes aegypti*. Данный вид комаров помимо вируса Зика переносит, вирус Денге и Чикунгунья.

Современные методы серологической диагностики, позволяют с высокой точностью выявлять возбудителей инфекционных заболеваний. Однако, для семейства флавивирусов, данная задача осложнена высокой гомологией аминокислотной последовательности белков представителей этого семейства. Одним из путей решения этой проблемы является поиск фрагментов белков флавивирусов обладающих максимальным различием. Таким образом, целью, был поиск фрагментов вирусного полипротеина обладающих максимальным аминокислотным различием и их характеристика при помощи иммуноферментного анализа.

Для выбора диагностически перспективных регионов белков вируса Зика был произведен биоинформатический анализ в системе BLAST в базе данных UniRef90 для каждого белка вируса Зика, в отдельности, затем выбирались фрагменты длиной не менее 9 а.о., не имеющие сходства с другими вирусами. Также принималась во внимание известная или предсказанная пространственная структура фрагмента и его потенциальная доступность для антитела. Биоинформатический анализ позволил отобрать 8 коротких фрагментов от 9 до 26 а.о., входящие в состав вирусных белков: E, C, NS1, NS2A, NS2B, NS4A и NS4B. Для создания конструкций для экспрессии генов, кодирующих фрагменты белков вируса Зика, использовали плазмиду pET32a, которая обеспечивает индуцибельную экспрессию целевых полипептидов с лидирующей аминокислотной последовательностью тиоредоксина A (TrxA). На основе найденных последовательностей были рассчитаны олигонуклеотидные последовательности включающие сайты рестрикции NcoI и XhoI (New England Biolabs, США). Гибридизацию олигонуклеотидов проводили при 98 ° C в течение 3 мин с последующим понижением температуры до комнатной в течение 2 часов. Гидролиз акцепторной плазмиды проводили по выбранным сайтам рестрикции в буферах и условиях, рекомендованных производителем эндонуклеаз (New England Biolabs, США). Продукты гидролиза подвергали электрофоретическому разделению, ДНК-фрагменты, соответствующие вектору, очищали от агарозного геля с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Sciences, США). Выделенные продукты гидролиза лигировали с олигонуклеотидами в соответствии с общепринятыми рекомендациями. Лигазную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *E.coli* штамм KRX (Promega, США). Клоны-рекомбинанты отбирали при помощи ПЦР и рестрикционного анализа. Целостность рамки считывания подтверждена секвенированием.

Полученные клоны-продуценты анализировались по уровню экспрессии после индукции в SDS-PAGE электрофорезе, при этом рекомбинантные белки были представлены бендами, отсутствующими в контролях, в области от ~19 кДа до ~22 кДа, что соответствует расчетным молекулярным массам белков. В качестве индуктора экспрессии использовали 20 %-ный раствор L-рамнозы (1:200 к жидкой среде), варьируя условия культивирования (18°C – 18 часов, 24°C – 16 часов, 37°C – 2 и 4 часа). Бактериальная масса после индукции осаждалась центрифугированием, после чего осадки ресуспензировали в лизирующем буфере (ФБР + 1 % Triton X-100) и дезинтегрировали обработкой ультра-

звук. Растворимость рекомбинантных белков в лизатах клеток оценивали по общепринятым методикам. Установлено, что основная часть химерных белков, содержащие фрагменты полипротеина вируса Зика, находится в нерастворимой фракции. В связи с этим тельца включения ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 30 мМ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 М NaCl , 20 мМ имидазола, pH 7,4, добавляли мочевины до конечной концентрации 8М. Химерные белки очищали методом аффинной хроматографии с использованием никель-сефарозы. Для получения нативной структуры проводили рефолдинг. Растворы очищенных химерных белков диализовали против буфера содержащего 6 М мочевины с последующим понижением концентрации мочевины. Полученную фракцию анализировали в белковом SDS-PAGE электрофорезе, степень чистоты препарата составила 95-98 %. Конечный выход продуктов в среднем составил 35 мг с 1 л культуры.

Определение специфичности взаимодействия химерных белков с антителами сыворотки проводили при помощи ТФ-ИФА. В качестве референс-образцов специфически взаимодействующих с антигенами вируса Зика, использовали сыворотки крови пациентов переболевших в 2016 году лихорадкой Зика после посещения Карибских островов.

Проведенный иммуноферментный анализ показал, что из 8 химерных белков с сыворотками специфически взаимодействуют только 2.

**НОВЫЕ ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТЫ
ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫЕ ГЕПТАМЕТИНОВЫМИ
ИНДОЦИАНИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ***

NOVEL DEOXYURIDINETRIPHOSPHATES FLUORESCENTLY
LABELED BY HEPTAMETHINE INDOCYANINE FLUOROPHORE

В.Е. Шершов, А.М. Золотов, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Россия*

V.E. Shershov, A.M. Zolotov, V.E. Kuznetsova, A.V. Chudinov

*Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Russia*

e-mail: shershov@list.ru

Аннотация

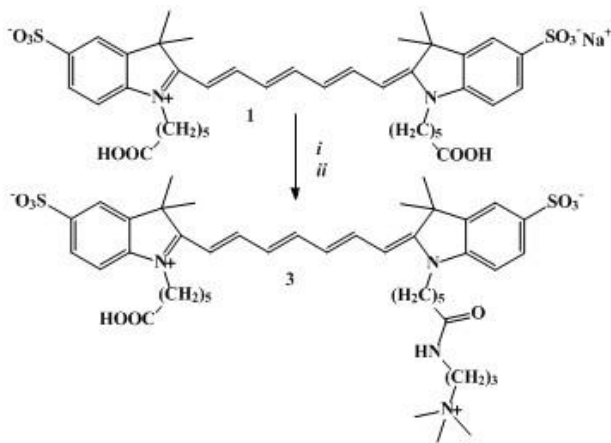
Цианиновые красители широко применяются в визуализации опухолей, обнаружении нуклеиновых кислот, фотографических процессах, нелинейной оптике. Для этих целей используют красители, флуоресцирующие в видимой области спектра, однако фоновая флуоресценция матрицы может вызывать значительные помехи. В ближней ИК-области 750-1000 нм, также известной как «биологическое окно», сигнал фона намного ниже, чем в видимой области спектра. Среди органических красителей индотрикарбоцианиновые красители с максимумом поглощения и флуоресценции в ближней ИК области представляют большой интерес вследствие их относительной стабильности, высоких значений молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» по проекту: «Разработка новых флуоресцентно-меченных дезоксиинуклеозидтрифосфатов для технологии биологических микрочипов и других приложений в медицинской диагностике».

Abstract

Cyanine dyes are widely applied in cancer imaging, nucleic acid detection, photographic processes, nonlinear optics. Most commonly used dyes fluoresce in the visible region of the spectrum where the background fluorescence of the matrix can cause considerable interference. In the near-IR region of 750–1000 nm also known as ‘biological window’, the background can potentially be much lower than in the visible region. Among organic dyes, indotricarbocyanine dyes with an absorption and fluorescence maximum in near-IR region are of great interest due to their relative stability, high molar extinction coefficient, and high fluorescent intensity.

В ряде случаев для проведения молекулярно-генетических анализов необходимы флуоресцентные маркеры с нейтральным зарядом. К таким флуорофорам относятся моносulfированные индотрикарбацианиновые красители. Однако, установлено, что по термо- и фотостабильности они уступают коммерчески-доступному дисulfированному красителю Су7. В связи с этим на основе симметричных дисulfированных красителей 1 и 2 нами синтезированы и исследованы электронейтральные индотрикарбацианиновые красители. Для компенсации заряда в структуру красителя 1 введена аммонийная группа в положение 1 индоленинового фрагмента, а в случае с красителем 2 вторая сульфогруппа в положении 5 модифицирована в сульфамидоалкильный заместитель.



i, NHS, HBTU, DMF, 20°C, 2 h; $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2$, $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, 20°C, 24 h;
ii, TsOMe, DMF, 20°C, 3 h.

Рис. 1. Схема синтеза электронейтрального индотрикарбацианинового красителя с аммонийной группой (3)

Краситель 3 получали селективным присоединением *N,N*-3-диметил-1,3-пропандиамина к одной из карбоксильных групп красителя 1 с последующей кватернизацией третичного амина при помощи метилового эфира *n*-толуолсульфокислоты (рис. 1).

Для получения модифицированного красителя 4 симметричный краситель 2 обрабатывали пентахлоридом фосфора в триметилфосфате, после чего проводили конденсацию с 6-аминогексановой кислотой (рис. 2).

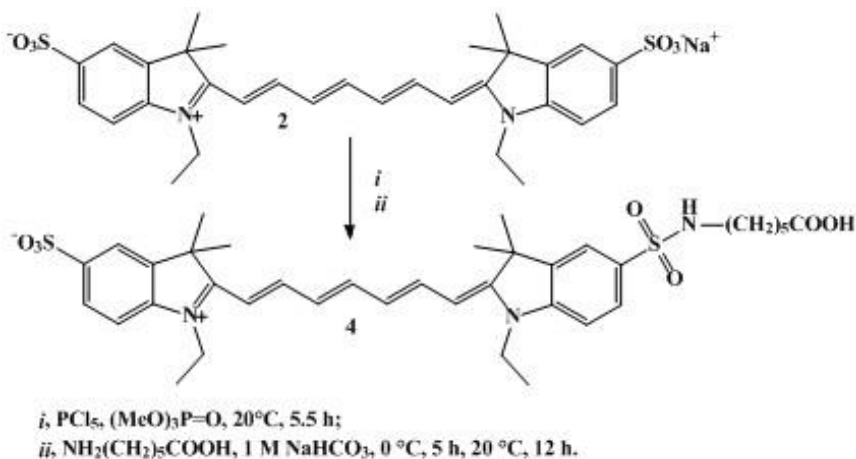


Рис. 2. Схема синтеза электронейтрального индотрикарбоинанового красителя с сульфамидоалкильным заместителем (4)

Красители 3 и 4 в фосфатно-солевом буферном растворе при pH 7.4 имеют максимумы поглощения 750 нм и 748 нм, максимумы флуоресценции 769 нм и 769 нм, коэффициенты молярной экстинкции 245000 и 223000, квантовые выходы флуоресценции 0.32 и 0.30, соответственно.

Синтезированные красители проверены на термо- и фотостабильность. Большей стабильностью, сравнимой с коммерческим Су7, обладает краситель 3, содержащий четвертичную аммониевую группу в положении 1 индолининового фрагмента. Краситель 4 с сульфамидоалкильным заместителем в положении 5 индолининового фрагмента показал более низкие значения термо- и фотостабильности.

На основе синтезированных красителей получены флуоресцентно-меченные дезоксиуридинтрифосфаты 5 и 6 (рис. 3).

Ферментативное встраивание флуоресцентно-меченных нуклеотидов в растущую цепь ДНК в ходе ПЦР исследовано с использованием

коммерческой тест системе «ТБ-Биочип». Продукты амплификации анализировали гибридизационным анализом на матрице специфических олигонуклеотидных зондов, иммобилизованных в гидрогелевых ячейках биочипа. Результаты гибридизации регистрировали на флуоресцентном анализаторе при возбуждении светом лазера на длине волны 760 нм и регистрации флуоресценции в диапазоне 813-850 нм.

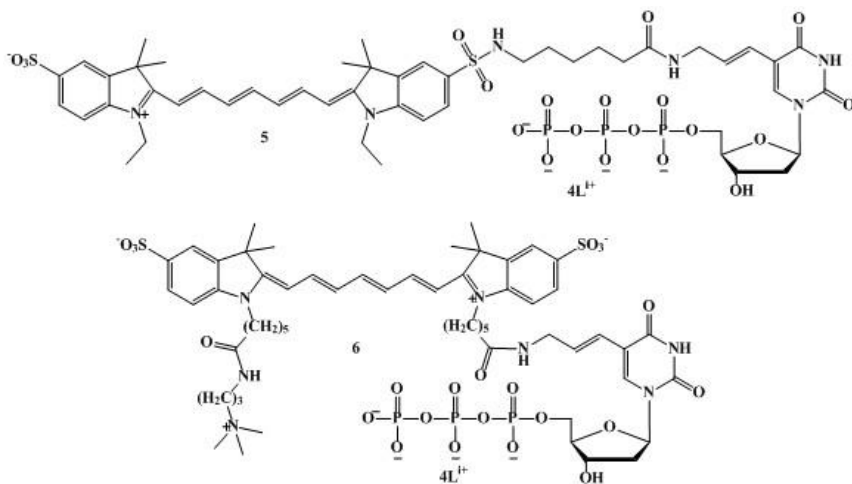


Рис. 3. Флуоресцентно-меченные дезоксиуридинтрифосфаты

Найдено, что полученные соединения (5, 6) не оказывают значительно-го ингибирующего эффекта и пригодны для использования в ПЦР. Лучшие результаты были достигнуты с использованием трифосфата 5.

Раздел 2**ВИРУСОЛОГИЯ**

**РАСШИРЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ПАНЕЛИ ENV-ПСЕВДОВИРУСОВ
ВИЧ-1 НА ОСНОВЕ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
В СИБИРСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ****DEVELOPMENT AND DESCRIPTION OF THE PANEL
OF ENV-PSEUDOVIRUSES HIV-1 ON THE BASIS OF ISOLATES
CIRCULATING IN THE SIBERIAN FEDERAL DISTRICT**

Н.Б. Андреева, Н.С. Щербакowa, Д.Н. Щербakov,
А.П. Рудометов, Л.И. Карпенко

*ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

N.B. Andreeva, N.S. Shcherbakova, D.N. Shcherbakov,
A.P. Rudometov, L.I. Karpenko

SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Использование технологии псевдовирuсов ВИЧ-1 является сегодня одним из самых популярных методов анализа нейтрализующей активности антител и оценки антиретровирусной активности препаратов в странах Европы и США. Этот метод позволяет проводить безопасную работу с вирусными частицами, несущими на своей поверхности гликопротеины множества субтипов и рекомбинантных форм, обеспечивая высокий уровень воспроизводимости и производительности.

Abstract

Using the technology of pseudoviruses HIV-1 is today one of the most popular methods for analyzing the neutralizing activity of antibodies and evaluating the anti-retroviral activity of drugs in countries of Europe and the USA. This method allows

safe operation with viral particles carrying on their surface glycoproteins of many subtypes and recombinant forms, providing a high level of reproducibility and productivity.

Разработка вакцины против ВИЧ-1, которая может вызвать защитный иммунитет, является одним из самых приоритетных направлений в глобальной борьбе с ВИЧ и СПИДом [1, 2].

Основной целью разработки вакцины против ВИЧ-1 является идентификация иммуногенов, способных индуцировать защитные титры широко нейтрализующих антител (bNAbs) против циркулирующих генетических вариантов ВИЧ-1.

Поскольку улучшенные вакцинные иммуногены входят в стадию детального доклинического анализа, анализы *in vitro*, используемые для оценки сывороток вакцинированных, также должны будут определять постепенное повышение в величине, широте и продолжительности ответов NAb [3].

Определение ответов на ВИЧ-1, вызванных реакцией нейтрализующих антител (nAb), должно соответствующим образом предусматривать множественные генетические подтипы и фенотипы нейтрализации вируса [4]. Генетическая изменчивость породила по меньшей мере девять генетических подтипов и все большее число циркулирующих рекомбинантных форм (CRF), где распространенность каждого подтипа и CRF колеблется географически [5].

Кроме того, текущие рекомендации по оценке профилей нейтрализации ВИЧ-инфицированных или вакцинированных лиц, а также по оценке антиретровирусной активности препаратов включают использование стандартных референсных панелей молекулярно-клонированных Env-псевдовирuses ВИЧ-1 и многоуровневого алгоритма тестирования [6].

Референсные вирусные панели должны представлять собой генетически и географически разнообразные подмножества вирусов с фенотипами нейтрализации, которые, как правило, являются первичными изолятами вируса, от которых должна защищать вакцина.

В настоящее время, описаны и используются стандартные референсные панели для подтипов ВИЧ-1 В и С [7, 8], и продолжаются усилия по созданию вирусных референсных панелей, в том числе и региональных (Российская Федерация), включающих дополнительные генетические подтипы.

Ранее, были получены *Env*-псевдовirusы ВИЧ-1, на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской и Кемеровской областях и Алтайском крае [8, 9].

Таким образом, целью работы является расширение и описание панели *Env*-псевдовирусов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих в регионах Сибирского федерального округа.

Материалы и методы

РНК ВИЧ-1.

Прокариотические культуры: *E. coli* штаммы Stb12.

Плазмиды: pSG3Δenv (backbone); pcDNA3.1Env, моноклональные широконейтрализующие антитела (NIH AIDs Reagents program).

Реактивы: лизирующий буфер (5X, Promega), система люциферазного анализа (Luciferase assay system, Promega)

Среды: LB-бульон, DMEM.

Методы, используемые при выполнении исследовательских работ: Трансформация прокариотических клеток, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами с вирусной РНК и последующая гнездовая ПЦР с целью получения кДНК гена *env* ВИЧ-1, электрофорез ДНК в агарозном геле, биоинформатический анализ, магнитная ко-трансфекция (MATra, PromoKine) эукариотических клеток, антителопосредованная нейтрализация ВИЧ-1 псевдовирусов в TZM-bl клетках.

Результаты

В результате проведенных экспериментальных исследований была проведена полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами с вирусной РНК и последующая гнездовая ПЦР с целью получения кДНК гена *env* ВИЧ-1. Нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов гена *env* были определены путем секвенирования на приборе ABI Prizm Genetic Analyzer 310. Для визуального контроля и анализа полученных секвенограмм, использовали программу BioEdit версии 7.0.9.0, для выравнивания генетических последовательностей – MAFFT версии 7. Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия при помощи программы RAxML версия 7.2.7. Рекомбинацию изучали, используя программу SimPlot, версия 3.5. В качестве референсных использовали ранее охарактеризованные последовательности субтипов и рекомбинантных форм ВИЧ-1, полученные из коллекции HIV Sequence Database (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>).

Далее, амплифицированный полноразмерный ген *env* был клонирован в составе коммерчески доступного вектора pcDNA 3.1/V5-His TOPO. Для получения псевдовирусов была проведена трансфекция культуры клеток 293Т сконструированными рекомбинантными плазмидами совместно с backbone плазмидой pSG3Δenv (дефектной по гену *env*).

Таким образом, получено и охарактеризовано 13 *env*-псевдовирусов на основе изолятов ВИЧ-1, циркулирующих на территории Новосибирской области, Алтайского края и Кемеровской области. Установлено генетическое разнообразие встречающихся в данных регионах изолятов ВИЧ-1: *env*-псевдовирусы относятся к рекомбинантной форме CRF63_02A1 и к субтипу A1. Исследована чувствительность полученных псевдовирусов к моноклональным широконейтрализующим антителам 2F5, 4E10, 2G12, VRC01, PG9.

Полученные варианты были включены в рабочую панель *env*-псевдовирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Литература

1. Barouch, D.H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine // *Nature*. 2008. Vol. 455. P. 613–619.
2. Walker B. D., Burton D.R. Toward an AIDS vaccine // *Science*. 2008. Vol. 320. P. 760–764.
3. Zhang M. Y., Barnett S. W., Ruprecht R. M., Scarlatti G., Fenyo E. M., Montefiori D. C., McCutchan F. E., Michael N.L. Recent advances in the characterization of HIV-1 neutralization assays for standardized evaluation of the antibody response to infection and vaccination // *Virology*. 2008. Vol. 375. P. 315–320.
4. Mascola J.R., Montefiori D.C. The role of antibodies in HIV vaccines // *Annual Review of Immunology*. 2010. Vol. 28. P. 413–444.
5. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic // *Journal of Infection*. 2013. Vol. 66. P. 391–400.
6. Mascola J. R., D'Souza P., Gilbert P., Hahn B. H., Haigwood N. L., Morris L., Petropoulos C.J., Polonis V.R., Sarzotti M., Montefiori D.C. Recommendations for the design and use of standard virus panels to assess neutralizing antibody responses elicited by candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines // *Journal of Virology*. 2005. Vol. 79. P. 10103–10107.
7. Li M., Gao F., Mascola J.R., Stamatatos L., Polonis V.R., Koutsoukos M., Voss G., Goepfert P., Gilbert P., Greene K.M., Bilska M., Kothe D.L., Salazar-Gonzalez J.F., Wei X., Decker J.M., Hahn B.H., Montefiori D.C. Human immunodeficiency virus type 1 *env* clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies // *Journal of Virology*. 2005. Vol. 79. P. 10108–10125.
8. Рудометов А.П., Щербакова Н. С. Создание *env*-псевдовирусов на основе штаммов ВИЧ-1, циркулирующих в Новосибирской области. // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2015. № 2. С. 19–21.
9. Щербакова Н.С., Султанов Л.В., Лукьянова В.А., Новикова О.А., Булатова Т.Н., Айкин С.С., Москалева Н.В., Конончук О.Н., Щербаков Д.Н. *Env*-псевдовирусы ВИЧ-1 субтипа A1 и CRF63_02A1 // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2016. №11. С. 176–177.

**ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА
СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ПАВЛОДАРСКОЙ ОБЛАСТИ
В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ 2016–2017 ГГ.**

**THE CIRCULATION OF INFLUENZA VIRUSES
AMONG THE POPULATION OF THE PAVLODAR REGION
IN THE EPIDEMIC PERIODS 2016–2017**

А.М. Баймухаметова¹, М.Қ. Қалқожаева¹, Н.Т. Сактаганов¹,
С.Б. Байсейіт¹, Н.Г. Кливлеева¹, К.Г. Мухтарова²

¹ РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК,
г. Алматы, Республика Казахстан

² Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы»
по Павлодарской области, Республика Казахстан

A.M. Baimukhametova¹, M.K. Kalkozhayeva¹, N.T. Saktaganov¹,
S.B. Bayseit¹, N.G. Klivleyeva¹, K.G. Muhtarova²

¹ Institute of Microbiology and Virology – CS MES,
Republic of Kazakhstan

² RSE on the REU «National Centre of Expertise»,
Republic of Kazakhstan

e-mail: Biochem_vir@mail.ru

Аннотация

В эпидемические периоды 2016–2017 гг. в лечебных учреждениях Павлодарской области от больных людей собрано 735 носоглоточных смывов. Результаты скрининга биопроб в РТ-ПЦР показали наличие генетического материала вируса гриппа в 255 пробах (30,05 %): вирус гриппа типа А – в 150 образцах (58,8 %), вирус гриппа В – в 75 (29,4 %). Субтипирование на вирусы гриппа типа А показало наличие РНК к вирусу гриппа А/Н3N2 во всех 150 положительных образцах. Таким образом, результаты исследования образцов, собранных в эпидемический сезон 2016–2017 гг. в Павлодарской области, в РТ-ПЦР указывают на циркуляцию вирусов гриппа А/Н3N2 и В, с преобладанием вируса гриппа А/Н3N2.

Abstract

In the epidemic seasons of 2016–2017 735 nasopharyngeal swabs were collected from people in hospitals of the Pavlodar Region. The results of screening of bioassay in RT-PCR showed the genetic material of the influenza virus in 255 samples (30.05 %): influenza A virus in 150 samples (58.8 %), influenza B virus in 75 (29.4 %). Subtyping found RNA of A/H3N2 virus in 150 influenza A virus positive samples. Thus, the study of samples collected in the epidemic season 2016–2017. In the Pavlodar region, by RT-PCR method, indicates to the circulation of influenza A/H3N2 and B viruses with the prevalence of influenza A/H3N2.

Целью настоящей работы было изучение особенностей циркуляции вирусов гриппа в эпидемические сезоны 2016–2017 гг. среди населения Павлодарской области. Объектом исследования стали 736 биологических проб, собранные от людей в возрасте от одного года до 65 лет, обратившиеся в лечебные учреждения с диагнозами грипп, ОРВИ.

Первичный скрининг биопроб на наличие генетического материала вируса гриппа типа А и В, проведенный в РТ-ПЦР с использованием реагентов «АмплиСенс» (г. Москва, РФ), позволил обнаружить РНК вируса гриппа в 225 образцах (30,5 % от общего числа проб). Вирус гриппа типа А выявлен в 150 смывах (58,8 %), вируса гриппа В – в 75 биопробах (29,4 %). Субтипирование вируса гриппа А позволило выявить во всех 150 смывах (58,8 %) РНК к вирусу гриппа А/Н3N2, РНК к вирусу гриппа А/Н1N1 не обнаружена.

В возрастной группе от года до 14 лет выявлено 85 положительных проб (33,3 %), из которых 54 смыва (21,1 %) – отнесены к вирусу гриппа Н3N2, 31 биопроба (12,1 %) – к вирусу гриппа типа В. В образцах, собранных от взрослых (15 лет и старше) из 140 положительных проб (54,9 %) – 44 (17,2 %) отнесены к вирусу гриппа типа В, 96 (37,6 %) обнаружили генетический материал вируса гриппа А/Н3N2.

Таким образом, результаты РТ-ПЦР указывают на циркуляцию в эпидемический период 2016–2017 гг. вирусов гриппа А/Н3N2 и В, с преобладанием вируса гриппа А/Н3N2.

ПОИСК ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ КАЛИЦИВИРУСОВ КРОЛИКОВ*

REVEALING THE FACTORS OF VIRULENCE OF RABBIT CALICIVIRUSES

Г.С. Бурмакина, А.С. Малоголовкин

*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии
и микробиологии»*

G.S. Burmakina, A.S. Malogolovkin

Federal research center for virology and microbiology

e-mail: Lila5757@yandex.ru

Аннотация

Два близкородственных калицивируса широко распространены и зачастую совместно циркулируют в популяциях диких и домашних кроликов: вирус геморрагической болезни кроликов и непатогенный калицивирус кроликов. Непатогенные калицивирусы кроликов вызывают бессимптомные кишечные инфекции у европейского кролика (*Oryctolagus cuniculus*), а вирус ГБК вызывает остропротекающую высококонтагиозную болезнь того же хозяина. Сравнение геномов этих вирусов позволит получить важную информацию о происхождении вирулентных форм и траектории их эволюции.

Выявление факторов, определяющих вирулентность вирусов, является ключевым вопросом при изучении инфекционных заболеваний. Эти исследования показывают, что некоторые области генома вируса, такие как домен РНК-зависимой РНК-полимеразы и 5 сайтов гена VP60, могут являться факторами его вирулентности.

Abstract

Two closely related caliciviruses co-circulate in population of wild and domestic: rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) and rabbit calicivirus (RCV). RCV causes benign enteric infections in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), while its close

* Данное исследование выполнено в рамках гранта Президента РФ (МК-9335.2016.11).

relative RHDV causes a highly pathogenic infection of the liver in the same host. The comparison of these viruses provides important information on the nature and trajectory of virulence evolution.

Revealing the factors that determine the virulence in viruses are key queries in the study of infectious disease evolution. These study suggest that some region of genome like the RdRp domen and 5 sites of VP60 gene are the factors of the virulence.

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) – остропротекающая высококонтагиозная болезнь диких и домашних кроликов (*Oryctolagus cuniculus*), первая вспышка которой была зарегистрирована в 1984 г. в Китае. Заболеваемость при ВГБК может достигать 70-80 %, а летальность – 90-100 %.

Вспышки ВГБК ежегодно регистрируют в разных странах мира, включая и Россию. Природным резервуаром возбудителя при этом являются популяции диких кроликов, в которых вирус циркулирует зачастую совместно с непатогенными калицивирусами кроликов. Непатогенные калицивирусы кроликов, обнаруженные в Европе и Австралии, вирус синдрома коричневой печени европейских зайцев и вирус ГБК представляют собой различные «линии» рода *Lagovirus* семейства *Caliciviridae*.

Анализ особенностей геномной организации и молекулярной эволюции калицивирусов кроликов необходим для понимания происхождения патогенных форм вируса и прогнозирования эволюционных изменения у циркулирующих вариантов.

Целью настоящего исследования являлся поиск факторов патогенности калицивирусов кроликов.

В связи с тем, что патогенные и непатогенные формы отличаются тканевым и клеточным тропизмом, способность калицивирусов кроликов реплицироваться в клетках печени может быть определена как основной фактор их вирулентности. А следовательно генетические маркеры вирулентности могут совпадать с сайтами, обуславливающими тканевую специфичность вируса. Для поиска генетических маркеров вирулентности нами был проведен анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей геномов различных представителей рода *Lagovirus* (вируса ГБК, непатогенных калицивирусов кроликов, слабо-вирулентного вируса MRCV и вируса синдрома коричневой печени европейских зайцев). Анализ включал в себя несколько этапов: поиск рекомбинационных событий; выявление мутаций в генах, кодирующих структурные и неструктурные белки вируса, потенциально связанных с

его вирулентностью; поиск аналога фактора вирулентности другого калицивируса – норовируса мышей.

Для многих как ДНК-содержащих, так и для РНК-содержащих вирусов роль рекомбинаций в эволюции была показана. С явлением рекомбинации может быть связано и возникновение патогенного вируса ГБК из непатогенных калицивирусов кроликов. В связи с этим первым этапом данной работы являлось определение участков генома, связанных с рекомбинацией, а также выяснение роли рекомбинации в эволюции калицивирусов кроликов. Более 80 последовательностей полных геномов калицивирусов кроликов были проанализированы с использованием программы Recombination Detection Program. В ходе исследований несколько штаммов вируса ГБК, принадлежащих к разным серотипам (RHDV и RHDV2), несколько штаммов непатогенных калицивирусов кроликов и слабовирулентный штамм MRCV были определены как рекомбинанты. Для рекомбинационного анализа штаммов вируса ГБК, выделенных на территории России были использованы последовательности гена VP60. Однако достоверных событий рекомбинации в ходе данного анализа не было выявлено. В связи с тем, что большинство рекомбинационных событий нами были детектированы между генами VP60 и RdRp или в области, кодирующей неструктурные белки, в дальнейшем планируется провести анализ с использованием полных геномов отечественных штаммов для понимания роли рекомбинации в их эволюции.

Проведенный нами анализ позволил заключить, что рекомбинация играет важную роль в эволюции представителей рода *Lagovirus*.

Одним из потенциально интересных элементов геномов данных вирусов может быть ген, кодирующий фермент РНК-зависимая РНК-полимераза. Сравнение аминокислотной последовательности данного гена непатогенных форм и различных штаммов ВГБК продемонстрировало гомологию около 90 %. РНК-зависимая РНК-полимераза имеет домен, характеризующийся консервативностью среди РНК-содержащих вирусов. Анализ данного домена у непатогенных калицивирусов кроликов, вируса ГБК (классический антигенный вариант, антигенный вариант RHDVa и тип RHDV2) и вируса синдрома коричневой печени европейских зайцев позволил выявить некоторые отличия. Так было обнаружено несколько аминокислотных замен в мотивах F и E у непатогенных калицивирусов, а также замена в мотиве D у вируса синдрома коричневой печени европейских зайцев. Несмотря на разницу биологических свойств среди классического антигенного варианта, антигенного варианта RHDVa и типа RHDV2 замен в данном домене не было обнаружено. Могут ли выявленные замены обуславливать разницу в активности РНК-зависимой РНК-полимеразы и влиять на вирулентность и/или тро-

пизм вируса следует определить в дальнейшем. Для чего нами были заклонированы фрагменты генома вируса ГБК отечественного штамма Манихино-09. Полноразмерная копия кДНК данного вируса будет использована нами для понимания роли аминокислотных замен в РНК-зависимой РНК-полимеразе, а также обнаруженных 5 аминокислотных замен в VP60 в формировании фенотипа вируса ГБК (вирулентные свойства, место вирусной репликации).

Альтернативной стратегией поиска генетических детерминант, ответственных за вирулентные свойства вируса ГБК, стал поиск аналога фактора вирулентности другого калицивируса – норовируса мышей. Ранее несколькими исследовательскими группами было показано наличие фактора вирулентности 1 (VF1), который позволяет вирусу противодействовать механизмам врожденного иммунного ответа на инфекцию (ингибирование IFN-бета). Поиск ортологов гена VF1 в геноме вируса ГБК и других калицивирусов кроликов продемонстрировал отсутствие схожих аминокислотных и нуклеотидных последовательностей в их геномах. Таким образом, можно заключить, что аналогичный фактор в геноме вируса ГБК отсутствует и его высокая вирулентность с ним не связана. Однако сам факт наличия белков – модуляторов иммунного ответа хозяина в геноме калицивирусов весьма интересен и, возможно, другие патогенные вирусы данного семейства содержат функционально схожие белки.

Таким образом, проведенный нами анализ позволил выявить несколько потенциальных функциональных детерминант вируса геморрагической болезни кроликов, ответственных за вирулентные свойства: домен РНК-зависимой РНК-полимеразы; область с 6150 по 6700 п.о. генома, на которую приходится 5 аминокислотных замен. Однако их роль должна быть в последствии подтверждена путем создания рекомбинантных штаммов вируса ГБК.

**АДАПТАЦИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОЗГА,
К РАЗЛИЧНЫМ КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ**

**ADAPTATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS
FROM HUMAN BRAIN TO DIFFERENT CELL CULTURES
INDUCES MULTIPLE GENOMIC SUBSTITUTIONS**

А.В. Гладышева^{1, 2}, Е.П. Пономарева¹, В.А. Терновой¹,
Т.П. Микрюкова¹, Е.В. Протопопова¹, А.Н. Швалов¹,
С.Н. Коновалова¹, Е.В. Чаусов¹, В.Б. Локтев^{1, 3}

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

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Институт Цитологии и Генетики СО РАН*

A.V. Gladysheva^{1, 2}, E.P. Ponomareva¹, V.A. Ternovoi¹,
T.P. Mikryukova¹, E.V. Protopopova¹, A.N. Shvalov¹,
S.N. Konovalova¹, E.V. Chausov¹, V.B. Loktev^{1, 3}

¹ *SRC VB «Vector», Russia*

² *Novosibirsk State University, Russia*

³ *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia*

e-mail: anastasiya.gladysheva@gmail.com

Аннотация

Из головного мозга человека был выделен вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), который был 6 раз параллельно пассирован на культурах клеток почек эмбриона свиньи (РЕК), человека (293) и нейроклетках мыши (Neuro-2a). Анализ полного генома полученных вариантов ВКЭ (штамм С11-13) показал, что адаптированный к клеткам ВКЭ приобретает множественные аминокислотные замены, по сравнению с первичным вариантом ВКЭ. Семь из восьми аминокислотных замен, произошедших в высоко-репликативном варианте С11-13 (РЕК), были картированы относительно неструктурных белков; 13 из 14 в хорошо-репликативном С11-13 (293) и все 4 замены низко-репликативного С11-13 (Neuro-2a) также были локализованы в неструктурных белках, преимущественно белках NS2a (2), NS3 (6) and NS5 (3). Замены NS2a₁₀₆₇ (Asn → Asp), NS2a₁₁₆₈ (Leu → Val) и NS3₁₇₄₅ (His → Gln) в гели-

казном домене NS3 были обнаружены во всех полученных вариантах ВКЭ. Картированные замены в белках NS2a, NS3 и NS5, по-видимому, играют ключевую роль при адаптации ВКЭ к различным типам клеток.

Abstract

The C11-13 strain from the Siberian subtype of tick-borne encephalitis virus (TBEV) was isolated from human brain using pig embryo kidney (PEK), 293, and Neuro-2a cells. Analysis of the complete viral genome of the C11-13 variants during six passages in these cells revealed that the cell-adapted C11-13 variants had multiple amino acid substitutions as compared to TBEV from human brain. Seven out of eight amino acids substitutions in the high-replicating C11-13(PEK) variant mapped to non-structural proteins; 13 out of 14 substitutions in the well-replicating C11-13(293) variant, and all four substitutions in the low-replicating C11-13(Neuro-2a) variant were also localized in non-structural proteins, predominantly in the NS2a (2), NS3 (6) and NS5 (3) proteins. The substitutions NS2a₁₀₆₇ (Asn → Asp), NS2a₁₁₆₈ (Leu → Val) in the N-terminus of NS2a and NS3₁₇₄₅ (His → Gln) in the helicase domain of NS3 were found in all selected variants. We postulate that multiple substitutions in the NS2a, NS3 and NS5 genes play a key role in adaptation of TBEV to different cells.

Клещевой энцефалит (КЭ) является одной из самых распространенных и опасных природно-очаговых инфекций. Вопрос генетической тождественности адаптированных лабораторных штаммов ВКЭ с природными вариантами, циркулирующими в очагах этой инфекции, остается фактически не исследованным.

Мы предположили, что высоко вирулентные варианты ВКЭ: выделенный из мозга человека, умершего от инфекции (*in vivo*) и адаптированные к клеткам варианты (*in vitro*), могут индуцировать множественные замены в геноме. Последующее секвенирование вирусного генома показало, что различные нуклеотидные и аминокислотные замены были вызваны приспособлением ВКЭ к лабораторным условиям. Основной целью нашего исследования было картирование аминокислотных замен, которые индуцируются во время реадaptации сибирского генотипа ВКЭ (выделенного из человеческого мозга) к различным клеточным культурам.

Адаптированные к клеткам варианты ВКЭ штамма C11-13 были получены после серии пассажей на культурах клеток почек эмбриона свиньи (PEK), человека (293) и нейроклетках мыши (Neuro-2a). После каждого пассажа производилось секвенирование, полученных вариантов. Филогенетический анализ показал, что штамм C11-13 может быть отнесен к сибирскому субтипу ВКЭ и имеет наибольшую степень родства со штаммами Lesopark-11 и Zausaev. Размер генома составил 10,838 нуклеотидов.

В 3' не транслируемом регионе были найдены делеции порядка 123 нуклеотидов по сравнению с ВКЭ KolaGoVo-2008.

Мы фиксировали вирусные титры и накопление антигена после каждого пассажа (рис. 1). Наибольший прирост титра наблюдался после третьего пассажа на клетках РЕК, когда были зарегистрированы первые аминокислотные замены в неструктурных белках. Средний уровень репликации наблюдался на клетках 293, а вариант Neuro-2a оказался еще менее репликативным и обладает меньшим количеством замен, по сравнению с другими вариантами.

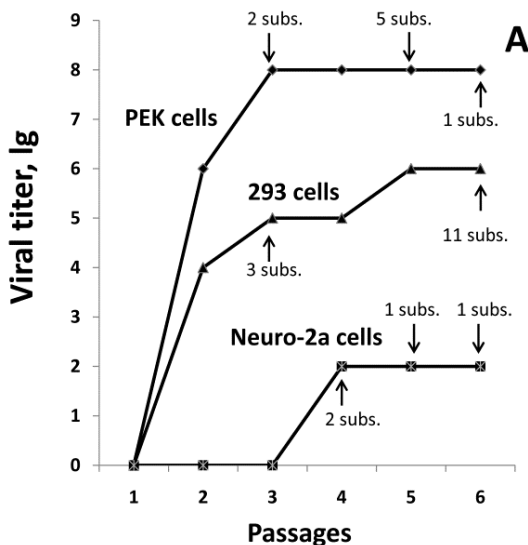


Рис. 1. Репликация штамма C11-13 ВКЭ на культурах клеток РЕК, 293, Neuro-2a. Вирусный титр определяли в 96-луночных планшетах на 7-й день после заражения

В результате 6 пассажей на клетках РЕК мы выявили 8 аминокислотных и 25 нуклеотидных замен. Аминокислотные замены были обнаружены в белках Е (1 замена), NS1 (1), NS2a (1), NS3, (3) и NS5 (2). На культурах клеток 293 и Neuro-2a также были выявлены замены в генах кодирующих как структурные, так и неструктурные белки: Е (1), NS1 (1), NS2a (2), NS3 (6), NS4a (1), NS4b (1), и NS5 (2). Замены NS2a₁₀₆₇(Asn → Asp), NS2a₁₁₆₈(Leu → Val) и NS3₁₇₄₅(His → Gln) идентичны для всех выбранных вариантов ВКЭ. Более того, была выявлена замена в белке NS4a идентичная для вариантов адаптированных к клеткам 293 и Neuro-2a. Семь

аминокислотных замен в C11-13(PEK) и 13 замен в C11-13(293) произошли в неструктурных белках, а в C11-13(Neuro-2a) все замены были локализованы в неструктурных белках. Замещение преимущественно происходило в белках NS2a (2), NS3 (6) и NS5 (3). Известно, что N-конец белка NS2a вируса японского энцефалита и вируса желтой лихорадки участвует в сборке инфекционных частиц и распространении вируса *in vitro*. А замены NS2a₁₀₆₇ (Asn → Asp) и NS2a₁₁₆₈ (Leu → Val) были обнаружены в N-конце белка NS2a и были идентичны для всех трех типов клеток.

Аминокислотные замены произошедшие в белках NS3 и NS5 были картированы относительно трехмерных моделей этих белков (рис. 2). Анализ моделей показал, что замены локализованы в доменах химотрипсин-подобной сериновой протеазы и геликазы для NS3 и вирусной РНК зависимой РНК полимеразы и метилтрансферазы для NS5.

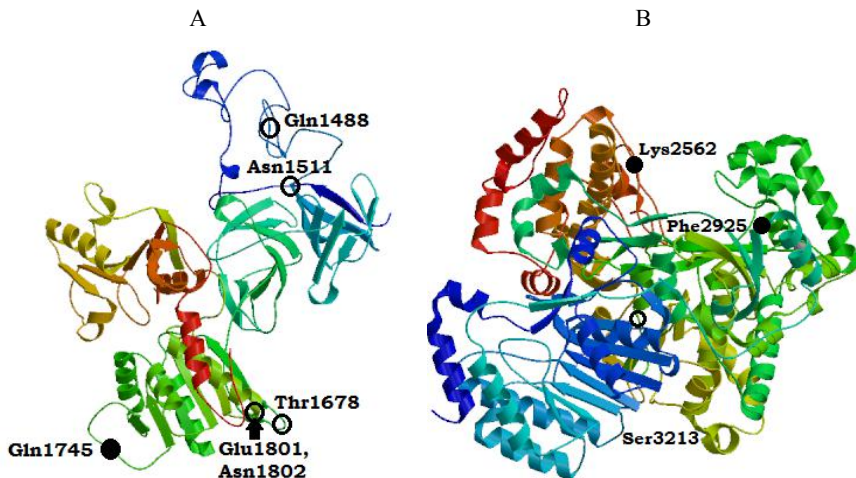


Рис. 2. Трехмерные модели полноразмерных белков NS3 (А) и NS5 (В) ВКЭ. Построение моделей было выполнено на основе шаблонных белков (PDB: 2WV9 и 4K6M) с использованием сервера Swiss-Model

Мы обнаружили шесть различных замен в NS3 для всех выбранных типов клеток. Две замены находились в N-концевом протеазном домене, вблизи каталитической триады протеазы (His51, Asp75, Ser135), в области центральной щели и четыре замены в С-концевом геликазном домене. Замена NS3₁₇₄₅ (His → Gln) была общей для всех рассмотренных вариантов.

Более того, замещение His₁₇₄₅ → Gln₁₇₄₅ вызвало изменение заряда с положительного на нейтральный в геликазном домене.

Замещение NS5₂₅₆₂ (Met → Lys) расположено в петле недалеко от β-листа в каталитической тетраде метилтрансферазы K-D-K-E. Замена NS5₂₉₂₅ (Ser → Phe) и NS5₃₂₁₃ (Ser → Pro) находятся предположительно в мотивах G и D соответственно домена РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5. Мотив G представляет собой основной мотив этого домена и замещение в мотиве G NS5₂₉₂₅ (Ser → Phe) было обнаружено для всех выбранных вариантов ВКЭ. Замена в мотиве D, который является активным центром РНК-зависимой РНК-полимеразы, была обнаружена только при пассировании на культуре клеток 293.

Таким образом, для вируса ВКЭ выделенного из человеческого мозга были получены варианты ВКЭ адаптированные к трем различным культурам клеток: РЕК, 293 и Neuro-2a. Результаты, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют о том, что множественные замены, произошедшие в белках NS2a, NS3 и NS5 играют ключевую роль при адаптации вируса к лабораторным условиям.

Литература

1. Ponomareva E.P., Ternovoi V.A., Mikryukova T.P., Protopopova E.V., Gladysheva A.V., Shvalov A.N., Kononova S.N., Chausov E.V., Loktev V.B. Adaptation of tick-borne encephalitis virus from human brain to different cell cultures induces multiple genomic substitutions // *Archive Virology*. 2017 June 19. Doi: 10.1007/s00705-017-3442-x.

СТАТУС ВПЧ И ЕГО ГЕНОМНАЯ ИНТЕГРАЦИЯ ВЛИЯЕТ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РШМ*

HPV STATUS AND ITS GENOMIC INTEGRATION AFFECT SURVIVAL OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER

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

¹ *Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук*

² *Национальный исследовательский Томский
государственный университет*

М.К. Ibragimova ^{1,2}, М.М. Tsyganov ¹, I.V. Deryusheva ¹

¹ *Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences*

² *National Research Tomsk State University*

e-mail: imk1805@yandex.ru

Аннотация

В исследование было включено 140 пациентов с верифицированным диагнозом рак шейки матки (РШМ) I-IV стадии. Для каждого из пациентов было проведено комплексное обследование: кольпоскопия, цитологический и гистологический анализ, детекция и генотипирование вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска, определение вирусной нагрузки и физического статуса ВПЧ 16 типа. Количество вирус-положительных случаев (инфицированность) среди пациентов с раком шейки матки – 108 больных (77,1 %), полученные данные относительно распространенности вируса согласуются с ранее полученными [1]. Также в результате исследования было определено прогнозирующее значение физического статуса вируса ВПЧ типа 16 для безрецидивной и общей выживаемости пациентов с РШМ.

Abstract

The study involved 140 patients with the stage I-IV cervical cancer patients. The comprehensive survey included colposcopy, cytological and histological analysis, detec-

* Работа выполнена в рамках программы «УМНИК» (договор № 11852ГУ/2017).

tion and genotyping of high-risk human papillomavirus, viral load and physical status of HPV16 DNA was evaluated.

The prevalence of virus-positive cases among the patients with cervical cancer patients was 77.1 %, this data are consistent with previously obtained [1]. As a result of the study the predictive value of the physical status of type 16 HPV was determined for relapse-free and overall survival of patients with CC.

Актуальность

В инфицированной клетке вирус папилломы человека (ВПЧ) может существовать в эписомальной форме (вне хромосом клетки) – считается доброкачественной, интегрированной (встроенной в геном клетки) – рассценивается как злокачественная форма персистенции вируса и смешанной форме (наличие свободного и встроенного в ДНК клетки-хозяина вируса) [2]. Прогрессия от клеточных изменений, связанных с ВПЧ-инфекцией, до развития рака шейки матки (РШМ) занимает около 10-40 лет, но редко может развиться 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 [3]. *Целью* настоящей работы явилась оценка безрецидивной и общей выживаемости HPV- позитивных с учетом физического статуса ВПЧ 16 типа и ВПЧ-негативных больных первичным РШМ.

Целью данного исследования являлось изучение клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе неоадьювантной химиотерапии (НХТ).

Материал и методы

В исследование было включено 140 пациенток в возрасте от 21 до 79 лет с первичным РШМ I-IVA стадий, проходивших обследование и лечение в Томском НИМЦ. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки. Всем пациенткам было проведено выявление и генотипирование ДНК ВПЧ. Из всех обследованных была выделена группа пациенток с носительством ВПЧ (n=108), далее для пациенток с ВПЧ 16 типа было также проведено определение физического статуса ДНК ВПЧ. Выявление, генотипирование ДНК ВПЧ и определение физического статуса ДНК ВПЧ 16 проводили методом ПЦР в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000 («Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/10⁵ клеток, порог релевантного количества вируса при-

нимался равным 3 Ig ДНК HPV/10⁵ клеток в соскобе. Выявление области E6 при отсутствии области E1/E2 интерпретировалось как интеграция ВПЧ в ДНК человека, выявление области E6 при наличии области E1/E2 – как смешанная форма вируса, отсутствие области E6 при наличии области E1/E2 – как эписомальная форма вируса. Оценку выживаемости проводили по методу Каплана-Майера.

Результаты

Из 108 ВПЧ+ больных РШМ ВПЧ 16 типа имели 87 больных (80,6 %) у которых был изучен физический статус вирусной ДНК. Остальные пациентки имели другие типы вируса: 31 тип ВПЧ – 8 пациенток (7,4 %), 33 тип ВПЧ – 6 пациенток (5,6 %), 56 тип ВПЧ – 4 пациентки (3,7 %), 45/52 типы ВПЧ – 3 пациентки (2,8 %), 39/51/58/59 типы ВПЧ – по 2 пациентки (1,9 %). Известно, что интеграция ВПЧ в клеточный геном признана одним из основных факторов развития тяжелых дисплазий и опухолевой трансформации эпителия шейки матки [4]. По результатам немногочисленных исследователей интегрированная форма ДНК ВПЧ встречается в пределах 35 % в зависимости от тяжести дисплазии, а эписомальная форма встречается реже – до 15 % случаев [5]. В ходе нашего исследования было показано, что частоты форм ВПЧ 16 типа распределились следующим образом: эписомальная форма встречалась в 8,9 % случаев, смешанная и интегрированная – в 64,6 % и 26,5 % случаев, соответственно, что не противоречит литературным данным.

Следующим шагом было изучение исхода заболевания в зависимости от физического статуса вируса. На рис. 1 представлена безрецидивная и общая выживаемость больных РШМ в зависимости от физического статуса вируса для HPV16+ больных, а также для сравнения представлена группа ВПЧ-пациенток.

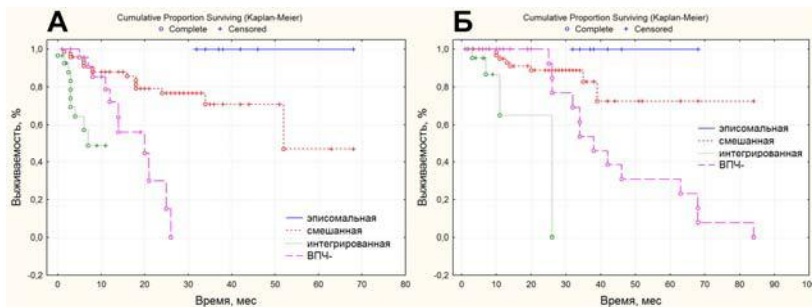


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных РШМ ($p = 0,0001$) (а) и общая выживаемость больных РШМ ($p = 0,0004$) (б)

Установлено, что распределение безрецидивной и общей выживаемости для всех четырех групп больных статистически значимо. У больных с эписомальной формой ВПЧ16 наблюдается 100 % безрецидивная и общая выживаемость. Самый неблагоприятный исход отмечается у больных с интегрированной формой ВПЧ 16 типа. Т.о., в результате исследования установлена прогностическая значимость физического статуса ВПЧ 16 типа в отношении безрецидивной и общей выживаемости больных РШМ. Наличие эписомальной формы вируса является благоприятным прогностическим фактором. Интегрированная форма вируса является крайне неблагоприятным фактором прогноза и выживаемость таких больных значительно ниже, чем ВПЧ- пациенток и больных со смешанной формой вируса.

Заключение

В результате проведенного исследования, были получены данные о выживаемости больных РШМ в зависимости от физического статуса вируса (для ВПЧ+ больных) и больных ВПЧ-негативным раком. Было показано, что наилучший прогноз имеют HPV+ пациентки с эписомальной формой вируса, наихудший – ВПЧ+ пациентки с интегрированной формой. Таким образом, проведение подобного анализа позволит в дальнейшем формировать группы повышенного риска для больных РШМ и обеспечивать персонализированный подход к лечению данной группы пациенток.

Литература

1. Уразова Л.Н., и др. Сравнительное изучение уровня инфицированности вирусом папилломы человека высокого онкогенного риска женского населения Томской области и республики Тыва // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 6(67). С. 15–20.
2. Jiang M.R., et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 and measurement of viral integration by quantitative PCR // J. of clinical microbiology. 2009. 47. Vol. 3. P. 521–526.
3. Bruni L., et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings // J. of Infectious Diseases. 2010. Vol. 202 (12). P. 1789–1799.
4. Fakhry, C., et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial // J. of the National Cancer Institute. 2008. Vol. 100. P. 261–269.
5. Saunier, M., et al. Analysis of human papillomavirus type 16 (HPV16) DNA load and physical state for identification of HPV16-infected women with high-grade lesions or cervical carcinoma // J. of clinical microbiology. 2009. Vol. 46. P. 3678–3685.

**ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ЧЕЛОВЕКА
НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОГО КАЗАХСТАНА
В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2016–2017 ГГ.**

**CIRCULATION OF HUMAN INFLUENZA VIRUSES
IN THE TERRITORY OF EAST KAZAKHSTAN
IN THE EPIDEMIC SEASONS 2016–2017**

М.Қ. Қалқожаева¹, А.М. Баймухаметова¹, Л.К. Амирасева¹,
М.Г. Шаменова¹, Т.И. Глебова¹, М.Е. Сагатова²

¹ РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии»
КН МОН РК, г. Алматы, Республика Казахстан

² РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы» КООЗ МЗ РК, Восточно-Казахстанская область, Республика Казахстан

M.K. Kalkozhayeva¹, A.M. Baimukhametova¹, L.K. Amirasheva¹,
M.G. Shamenova¹, T.I. Glebova¹, M.E. Sagatova²

¹ Institute of Microbiology and Virology – CS MES, Republic of Kazakhstan

² RSE on the REU «National Centre of Expertise» CPPH MH
Republic of Kazakhstan

e-mail: Biochem_vir@mail.ru

Аннотация

В эпидемические периоды 2016–2017 гг. в лечебных учреждениях Восточно-Казахстанской области от больных людей собрано 499 носоглоточных смывов. Результаты биопроб в РТ-ПЦР показали наличие генетического материала вируса гриппа в 145 пробах (29,05 %): вирус гриппа типа А – в 85 образцах (17,03 %), вирус гриппа В – в 60 (12,02 %). Субтипирование на вирусы гриппа типа А показало наличие РНК к вирусу гриппа А/Н3N2 во всех 85 положительных образцах. Таким образом, результаты образцов, собранных в эпидемический сезон 2016–2017 гг. в Восточно-Казахстанской области в РТ-ПЦР, указывают на циркуляцию вирусов гриппа А/Н3N2 и В, с преобладанием вируса гриппа А/Н3N2.

Abstract

In epidemic periods seasons 2016–2017 499 nasopharyngeal swabs were collected from people in hospitals of the Eastern-Kazakhstan Region. The results of screening of bioassay in RT-PCR showed the genetic material of the influenza virus in 145 samples (29.05 %): influenza A virus in 85 samples (17.03 %), influenza B virus in 60 (12.02 %). Subtyping found RNA of A/H3N2 virus in 85 influenza A virus positive samples. Thus, the study of samples collected in the epidemic season 2016–2017 in the East Kazakhstan region, by RT-PCR method, indicates to the circulation of influenza A/H3N2 and B viruses with the prevalence of influenza A/H3N2.

Грипп относится к числу инфекций, которые вызывают непредсказуемые, чрезвычайные эпидемические ситуации. Это – высококонтагиозные острое заболевание, поражающее людей с незапамятных времен. Каждый год в Республике Казахстан регистрируется более 1 млн. случаев гриппа и гриппоподобных заболеваний, не учитывая людей не обратившихся в медицинские учреждения. Постоянный надзор за гриппом является необходимым мероприятием как для расшифровки причин текущих эпидемий, так и для проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий, в том числе для обоснованных рекомендаций по ежегодному обновлению состава гриппозных вакцин и при разработке диагностических препаратов.

С 1 октября 2016 г. по март 2017 г. в лечебных учреждениях Восточно-Казахстанской области от больных людей с диагнозом «ОРВИ», «ОРЗ», «бронхит» и «пневмония» собрано 499 носоглоточных смывов.

Первичный скрининг образцов в РТ-ПЦР с использованием реагентов «АмплиСенс» (г. Москва, РФ) показал, что генетический материал вируса гриппа обнаружен в 145 носоглоточных смывах (29,05 % случаев). Вирус гриппа типа А – в 85 образцах (17,03 %), вирус гриппа В – в 60 пробах (12,02 %). Субтипирование на вирусы гриппа типа А показало наличие РНК к вирусу гриппа А/Н3N2 во всех 85 положительных образцах, РНК к вирусу гриппа типа А/Н1N1 не выявлены.

Таким образом, результаты образцов, собранных в эпидемический сезон 2016–2017 гг. в Восточно-Казахстанской области в РТ-ПЦР, указывают на циркуляцию вирусов гриппа А/Н3N2 и В, с преобладанием вируса гриппа А/Н3N2.

РОЛЬ ВИРУСОВ КОКСАКИ В1-6 В ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

ROLE OF COXSACKIEVIRUSES B1-6 IN ENTEROVIRUS INFECTION

О.И. Канаева, Н.И. Романенкова, М.А. Бичурина, Н.Р. Розаева

*ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
Роспотребнадзора, Россия*

O. Kanaeva, N. Romanenkova, M. Bichurina, N. Rozaeva

*Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology
in Saint-Petersburg, Russia*

Аннотация

Проведён анализ выделения энтеровирусов Коксаки В1-6 у детей с синдромом острого вялого паралича, больных энтеровирусной инфекцией и у здоровых детей без признаков заболевания, проживающих на 14 территориях РФ. Установлено, что данные энтеровирусы стабильно выделяются у всех трёх категорий обследованных, обуславливая преимущественно спорадические случаи энтеровирусного менингита.

Abstract

The aim of this research was study of the role of Coxsackieviruses B in the etiology of enterovirus infection and other forms of neurological pathology and also the frequency of isolation of enteroviruses excreted by children living on the territory of the Russian Federation.

Государственная регистрация заболеваемости энтеровирусной инфекцией (ЭВИ) в Российской Федерации (РФ) была введена с 2006 г. После сертификации в 2002 г. РФ в составе Европейского региона как территории, свободной от полиомиелита, роль надзора за ЭВИ возросла. Спектр клинических проявлений ЭВИ широк: от бессимптомного носительства и лёгких форм, таких как экзантема полости рта и конечностей, до тяжёлых (серозный менингит, энцефалит, острый вялый паралич, сепсис-подобное заболевание новорождённых, миокардит и др.) [1, 2, 3]. Наиболее частым проявлением ЭВИ, требующим госпитализации, является энтеровирусный менингит (ЭВМ) [4]. Возбудителями ЭВМ могут быть различные сероти-

пы энтеровирусов ЕСНО, Коксаки А, Коксаки В1–6 [5, 6]. Наиболее часто вспышки ЭВМ в конце XX – начале XXI вв. были вызваны вирусами Коксаки В5, ЕСНО 6, 9, 11, 13, 30 [7, 8]. Энтеровирусы Коксаки В1–6, помимо ЭВМ, могут вызывать острый вялый паралич (ОВП), миокардит, перикардит и другие клинические формы ЭВИ.

Санкт-Петербургский региональный центр (СПб РЦ) по надзору за полиомиелитом и острыми вялыми параличами курирует 14 административных территорий РФ. В период с 2000 по 2016 г. в вирусологической лаборатории СПб РЦ в рамках Программы ликвидации полиомиелита было исследовано 1722 пробы фекалий от больных детей с диагнозом «Острый вялый паралич». Исследование проб фекалий от больных разными формами энтеровирусной инфекции осуществлялось в рамках дополнительного надзора с 2006 по 2016 г. Была исследована 20561 проба. Кроме того, было исследовано 100 проб от здоровых детей из детских дошкольных учреждений (ДДУ) с одной территории Северо-Западного федерального округа (СЗФО).

Выделение неполиомиелитных энтеровирусов (НПЭВ) проводили на культурах клеток RD и Нер-2 в соответствии с Руководством по лабораторным исследованиям полиомиелита ВОЗ. Идентификацию энтеровирусов осуществляли в реакции нейтрализации с использованием специфических диагностических сывороток производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова и RIVM (Bilthoven, Netherlands). Для некоторых штаммов с помощью секвенирования была определена последовательность нуклеотидов участка генома VP1. Нуклеотидные последовательности, полученные при секвенировании, были депонированы в базу данных GenBank. Статистический анализ проводили с определением средних ошибок. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

При исследовании материала от детей с синдромом острого вялого паралича НПЭВ были изолированы из 5,2±0,8 % проб. Среди выделенных вирусов преобладали энтеровирусы Коксаки В1–6. Процент их выделения от больных ОВП в разные годы колебался от 1,8 % до 3,0 %. ЭВ Коксаки В1–6 с преобладанием серотипов Коксаки В3 и Коксаки В5 были обнаружены у 16 детей с клиническими симптомами ОВП, проживающих на 9 территориях России. По одному случаю выделения Коксаки В5 было обследовано 7 контактных лиц: дети в возрасте от 8 месяцев до 7 лет, прибывшие в Санкт-Петербург из Азербайджана и проживающие в одной квартире. У всех здоровых детей, находящихся с больным в близком контакте, были выделены энтеровирусы Коксаки В5.

У больных энтеровирусной инфекцией НПЭВ в среднем за 11 лет выделялись с частотой 13,6±0,2 %. Всего за этот период было изолировано и

идентифицировано 2795 неполиомиелитных энтеровирусов разных серотипов. Превалировали ЭВ Коксаки В1–6, ЕСНО 30 и ЕСНО 6, суммарный удельный вес которых был равен 73 %. Именно эти серотипы явились этиологическим фактором энтеровирусного менингита, наиболее тяжелой формы ЭВИ.

В общей сложности у больных энтеровирусной инфекцией было выделено 715 вирусов Коксаки В1–6, частота выделения была равна $3,5 \pm 0,4$ %. Во все годы наблюдения доля вирусов Коксаки В1–6 в структуре всех изолированных НПЭВ была высокой (от 14 до 54 %), в среднем составив $26,0 \pm 0,8$ %. Вирусы этих серотипов выделялись в основном при спорадических случаях энтеровирусного менингита. В годы отсутствия выраженных сезонных подъёмов заболеваемости, вызванных вирусами ЕСНО 30 (в 2007–2009 гг. и в 2013 г.) и ЕСНО 6 (2008 г. и 2011 г.), вирусы Коксаки В1–6 занимали лидирующее положение. Их доля составила $54,1 \pm 3,1$ % среди трех ведущих серотипов ЭВ, являющихся возбудителями энтеровирусных менингитов, достоверно превышая ($p \leq 0,001$) доли энтеровирусов ЕСНО 30 и ЕСНО 6, равные $24,2 \pm 2,3$ % и $21,7 \pm 2,1$ % соответственно.

На ряде территорий СПб РЦ от больных ЭВИ энтеровирусы Коксаки В 1–6 выделяли регулярно и с большой частотой. Так, в 2006 г. на территории Архангельской области от больных ЭВИ выделялись только вирусы Коксаки В1–6, преимущественно серотипа Коксаки В 5 (66,7 %). Именно эти серотипы НПЭВ обусловили тяжелую клиническую картину ЭВИ, когда доля ЭВМ в структуре клинических форм инфекции составила 98,9 %.

В целях изучения циркуляции НПЭВ среди здоровых детей в организованных коллективах было исследовано 100 проб от детей из семи ДДУ с одной из северных территорий СЗФО. Данная территория являлась «молчащей» в связи с отсутствием регистрации на ней случаев острых вялых параличей в течение нескольких предыдущих лет. Неполиомиелитные энтеровирусы при отсутствии симптомов заболевания были обнаружены у 22 детей из пяти детских учреждений. 73 % выделенных у этих детей энтеровирусов были представлены вирусами Коксаки В1–6. В трех организованных коллективах ЭВ Коксаки В3 и Коксаки В4 были представлены единичными находками. В одном из детских учреждений циркулировали ЭВ Коксаки В2, в другом ДДУ была выявлена циркуляция ЭВ Коксаки В3. Молекулярный анализ показал, что штаммы вирусов Коксаки В3, изолированные в одном из ДДУ, были идентичны на секвенированном участке, что свидетельствует о происхождении вируса из одного источника. Тесные контакты среди детей 3–4 лет в организованных коллективах способствуют распространению энтеровирусов после их заноса в детские дошкольные учреждения. В результате филогенетического анализа было установлено,

что штаммы Коксаки В3 и В4 были близки штаммам, выделенным в европейских странах и РФ в последние 15 лет.

Исходя из вышеизложенного и учитывая стабильность циркуляции энтеровирусов Коксаки В1–6, периодические подъёмы заболеваемости разной интенсивности, вызываемые этими вирусами, находки разных серотипов вирусов Коксаки В у контактных лиц и у здоровых детей в детских организованных коллективах, можно отнести вирусы Коксаки В 1–6 к так называемым «эндемичным» вариантам энтеровирусов, которые постоянно циркулируют на многих административных территориях России. Молекулярное исследование выделенных штаммов способствует углублённому изучению вирусов, характерных для нашей страны, и пониманию особенностей их циркуляции на разных территориях в разные временные периоды. Выявление закономерностей эпидемического процесса энтеровирусной инфекции позволит своевременно и эффективно прогнозировать и предотвращать осложнения эпидемической ситуации при энтеровирусной инфекции.

Литература

1. Лобзин Ю.В. Энтеровирусные инфекции: руководство для врачей / Ю.В. Лобзин, Н.В. Скрипченко, Е.А. Мурина. СПб.: НИИДИ, 2012. 432 с.
2. Kamball CC, Alirezai M, Whitton JL. Type B coxsackieviruses and their interactions with the innate and adaptive immune systems. *Future Microbiol.* 2010 Sep; 5(9). P. 1329–47.
3. Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feuer R. Enterovirus Infections of the Central Nervous System. *Virology.* 2011 Mar; 411(2). P. 288–305.
4. Лукашев А.Н. Социально-экономическая значимость энтеровирусной инфекции и ее роль в структуре инфекционной патологии в мире / А.Н. Лукашев, О.Е. Иванова, Л.В. Худякова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010. N 5. С. 113–120.
5. Бессергенева И.К. Тенденция эпидемического процесса неполиомиелитных энтеровирусных заболеваний в условиях мегаполиса / И.К. Бессергенева [и др.] // ЗНиСО. 2010. № 6. С. 25–28.
6. CDC. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echovirus 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity – United States, 2003. *Morbidity and Mortality Wkly Rep.* 2003 Aug; 52(32). P. 761–4.
7. Лукашев А.Н. Молекулярная эпидемиология вируса ЕСНО 30 на территории России и стран СНГ / А.Н. Лукашев [и др.] // Вопросы вирусологии. 2004. Т. 49, N 5. С. 12–16.
8. Khetsuriani N., LaMonte-Fowlkes A., Oberste M.S., Pallansch M.A. Enterovirus surveillance – United States, 1970–2005. *Morbidity and Mortality Wkly Rep.* 2006 Sep; 55(8). P. 1–20.

ПОДАВЛЕНИЕ ИНФЕКЦИИ ГРИППА В КЛЕТКАХ A549 С ПОМОЩЬЮ TRIM14 ЧЕЛОВЕКА *

SUPPRESSION OF INFLUENZA A VIRUS INFECTION IN A549 CELLS VIA TRIM14

Г.В. Ковалева¹, Н.А. Никитенко², И.В. Макарова¹, А.А. Лысенко²,
А.И. Тухватулин², Л.Е. Андреева¹, Д.Ю. Логунов²,
В.В. Ненашева¹, В.З. Тарантул¹

¹ ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук
² ФГБУН «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации

G.V. Kovaleva¹, N.A. Nikitenko², I.V. Makarova¹, A.A. Lysenko²,
A.I. Tukhvatulin², L.E. Andreeva¹, D.Y. Logunov²,
V.V. Nenasheva¹, V.Z. Tarantul¹

¹ *Institute of Molecular Genetics, Russian Academy
of Sciences, Moscow, Russia*
² *N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology
and Microbiology, Moscow, Russia*

e-mail: winter888@bk.ru

Аннотация

Мы показали, что повышенная экспрессия гена *TRIM14* приводит к значительному подавлению репродукции вируса гриппа в клетках линии A549 через 24-72 ч после инфекции. На поздних этапах вирусной инфекции в клетках с повышенной экспрессией *TRIM14* происходит ингибирование интерферонов I типа.

* Работа поддержана грантами РФФИ 15-04-07752, 16-04-00475, Молекулярная и клеточная биология РАН, грантами Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1746.2017.7 и МК-2480.2017.7.

Abstract

We found that enhanced expression of *TRIM14* significantly suppresses Influenza A virus reproduction in A549 cells after 24-72 h post infection. The inhibition of type I interferons was observed at the late stages of viral infection in the cells with upregulated *TRIM14* gene.

Грипп – острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом гриппа. Вирус гриппа, как правило, поражает верхние дыхательные пути, трахею, бронхи, а также легкие; заболевание может приводить к серьезным осложнениям и даже летальному исходу. Вирус данного типа вызывает заболевания средней или сильной тяжести, приобретающие эпидемический характер (Fukuyama and Kawaoka, 2011). Высокий уровень заболеваемости гриппом и значительный риск его массового распространения среди всего населения обуславливают актуальность изучения механизмов клеточного ответа на инфекцию.

В последние годы внимание исследователей привлекло семейство белков TRIM (tripartite-motif), члены которого являются участниками врожденного иммунного ответа против вирусных инфекций. В частности, было показано, что инфекция вируса гриппа А ингибируется TRIM22 (Di Pietro et al., 2013) и TRIM59 (Liu et al., 2016).

Мы предположили, что ген *TRIM14*, кодирующий адаптерный белок TRIM14, также может быть вовлечен в клеточный ответ на инфекцию вируса гриппа. Впервые мы обнаружили высокий уровень экспрессии *TRIM14* (ранее известный как *PUB*, *KIAA0129*) в лимфомах, ассоциированных с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) (Nenasheva et al., 2001) и с вирусом иммунодефицита обезьян (SIV) (Tarantul et al. 2001). Повышенная экспрессия гена *TRIM14* наблюдалась также в лейкоцитах у пациентов с гриппом А (Ramilo et al., 2007) и в первичных эпителиальных клетках человека, инфицированных риновирусом (Chen et al., 2006). Было установлено, что TRIM14 подавляет размножение вируса Sindbis (Nenasheva et al., 2015). Кроме того, этот белок ингибирует инфекцию вируса гепатита С путем прямого взаимодействия с вирусным неструктурным белком NS5A (Wang et al., 2016).

Для проверки гипотезы о возможном участии гена *TRIM14* в клеточном ответе на грипп была получена поликлональная культура клеток A549 аденокарциномы легких человека с повышенной экспрессией этого гена. Затем эти клетки (A549-TRIM14) и контрольные клетки (A549) заражали птичьим непатогенным вирусом А гриппа штамма A/mallard duck/Pennsylvania (H5N2), адаптированным к мыши (GI: 1102585018) с множественностью инфекции 0.1 БОЕ/клетку. Через 12, 24, 48 и 72 ч оценивали титр вирусного потомства в вирусосодержащей культуральной среде.

В результате эксперимента были выявлены значимые различия титра вирусного потомства при репликации вируса в клетках линий A549 и A549- TRIM14 (рис. 1). Титр потомства вируса гриппа в культуральной среде, собранной с клеток A549 TRIM14 через 24 и 48 ч, снизился на один порядок по сравнению с контролем, а через 72 ч – на три порядка по сравнению с контролем.

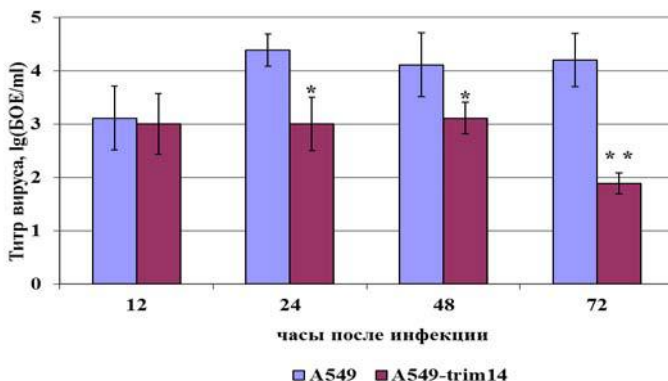


Рис. 1. Титр потомства вируса гриппа при репликации в клетках линий A549 и A549 TRIM14 (логарифмическая шкала). Данные были проанализированы с помощью двустороннего непарного t-теста (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Известно, что важную роль в клеточном ответе на вирусную инфекцию и в том числе на инфекцию вируса гриппа играют интерфероны I типа (Shim et al., 2017). Ранее мы показали, что в клетках HEK293 повышенная экспрессия *TRIM14* приводила к более высокому уровню транскрипции *INFα*. Анализ транскрипции интерферонов в клетках A549-TRIM14 показал, что повышенная экспрессия гена *TRIM14* вызывает достоверное увеличение количества мРНК *INFα* в 2,5-4,6 раза и мРНК *INFβ* – в 2,7-3,3 раза по сравнению с контролем. Мы предполагаем, что ингибирующее действие TRIM14 на репродукцию вирус гриппа может быть связано с усилением транскрипции интерферонов в клетках A549-TRIM14.

Кроме того, мы проанализировали изменение транскрипции интерферонов в клетках A549-TRIM14 и контрольных клетках A549 после инфекции вирусом гриппа и обнаружили (рис. 2), что в клетках с повышенной экспрессией гена *TRIM14* происходит сильное подавление экспрессии интерферонов.

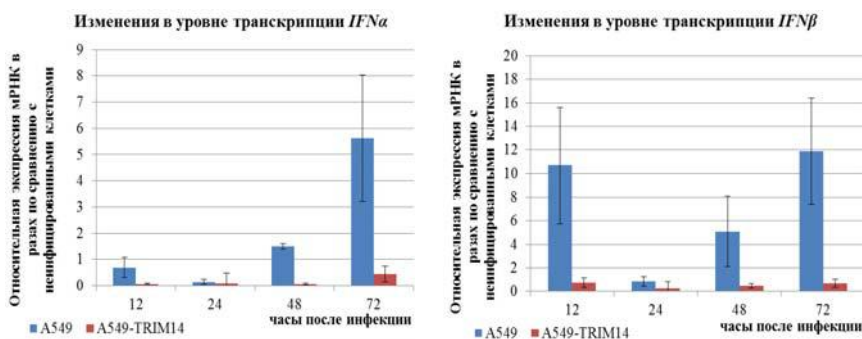


Рис. 2. Изменения в уровне транскрипции *IFNα* и *IFNβ* в клетках линии A549- TRIM14 при инфекции вирусом гриппа по сравнению с клетками A549

В последние годы накапливаются данные, что интерфероны I типа могут играть в клетках как положительную противовирусную роль, так и, наоборот, вызывать иммуносупрессию или неадекватный иммунный ответ (Davidson et al., 2015; Teijaro, 2016). Наши данные позволяют предположить, что ген *TRIM14* участвует в регуляции интерферонов I типа, понижая их возможное отрицательное воздействие на иммунную систему.

Литература

1. Chen Y, Hamati E, Lee PK, Lee WM, Wachi S, Schnurr D, Yagi S, Dolganov G, Boushey H, Avila P, Wu. Am J Respir Cell Mol Biol. 2006 34:192–203.
2. Davidson S, Maini MK, Wack A. J Interferon Cytokine Res. 2015 35:252–64.
Di Pietro A, Kajaste-Rudnitski A, Oteiza A, Nicora L, Towers GJ, Mechti N, Vicenzi E. J Virol. 2013 87:4523–4533.
3. Fukuyama S, Kawaoka Y. Curr Opin Immunol. 2011 23:481–486.
4. Liu B, Li NL, Shen Y, Bao X, Fabrizio T, Elbahesh H, Webby RJ, Li K. J Virol. 2016 90:4369–4382.
5. Nenasheva VV, Kovaleva GV, Uryvaev LV, Ionova KS, Dedova AV, Vorkunova GK, Chernyshenko SV, Khaidarova NV, Tarantul VZ. Immunol Res. 2015 62:255–262.
6. Nenasheva VV, Maksimov VV, Nikolaev AI, Tarantul VZ. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 2001 4:27–31.
7. Ramilo O, Allman W, Chung W, Mejias A, Ardura M, Glaser C, Wittkowski KM, Piqueras B, Banchereau J, Palucka AK, Chaussabel D. Blood 2007 109:2066–2077.
8. Tarantul V, Nikolaev A, Hannig H, Kalmyrzaev B, Muchoyan I, Maximov V, Nenasheva V, Dubovaya V, Hunsmann G, Bodemer W Neoplasia 2001 3:132–142.
9. Wang S, Chen Y, Li C, Wu Y, Guo L, Peng C, Huang Y, Cheng G, Qin FX. Sci Rep. 2016 6:32336.
10. Shim JM, Kim J, Tenson T, Min JY, Kainov DE. Viruses. 2017 9(8). pii: E223.
11. Teijaro JR. Adv Immunol. 2016 132:135–158.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА КЕМЕРОВО В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ, СОБРАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ

DETECTION OF KEMEROVO VIRUS IN IXODES TICKS COLLECTED IN THE KOMI REPUBLIC (RUSSIA)

Е.И. Кривошеина^{1,2}, А.И. Кузнецов^{1,2}, М.Ю. Карташов¹, Т.П. Микрюкова¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
² ФГБОУ ВО «Новосибирский ГАУ»

E.I. Krivosheina^{1,2}, A.I. Kuznetsov^{1,2}, M.Yu. Kartashov¹, T.P. Mikryukova¹

¹ SRC VB «Vector» Rospotrebnadzor
² FSBEI HE «Novosibirsk SAU»

Аннотация

В клещах вида *Ixodes persulcatus*, собранных в Республике Коми, впервые выявлена РНК вируса Кемерово (KEMV). Уровень инфицированности клещей составил $0,8 \pm 0,2$ %. Определены нуклеотидные последовательности фрагмента 1 генома KEMV.

Abstract

The RNA of Kemeroovo virus has been first detected in *Ixodes persulcatus* ticks collected in the Komi Republic in $0,8 \pm 0,2$ % samples from individual ticks. Nucleotide sequences of the segment 1 of KEMV genome (RNA-dependent RNA polymerase) were determinate and analyzed.

Введение

Вирус Кемерово (KEMV) является представителем рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae* и входит в состав серокомплекса Грейт-Айленд (Great Island). Геном вируса составляет около 20 тыс. п.н. и представлен двухнитевой РНК, разделенной на 10 сегментов размером от 707 до 3896 п.н. Впервые данный вирус был выделен в 1962 году от больных людей и из клещей вида *Ixodes persulcatus*. Вирус Кемерово вызывает лихорадочное заболевание у человека с резким повышением температуры тела (до $39-40^{\circ}\text{C}$), инъекцией склер и конъюнктивы, а также появлением пятнисто-папулезной или мелкоточечной сыпи. Описано развитие миокардитов и менингоэнцефалитов у пациентов. Основным переносчиком вируса считаются иксодовые клещи вида

I. persulcatus. Развитие и совершенствование методов генетической диагностики KEMV позволило недавно обнаружить РНК KEMV в новых географических районах. Генетические маркеры KEMV были выявлены в иксодовых клещах в Сибири, на Урале, а также в центральной части Европейской части России [Dedkov et al., 2014; Tkachev et al., 2017].

В последние годы регистрируется резкий рост случаев укуса иксодовыми клещами, а также заболеваемости клещевым энцефалитом и клещевым боррелиозом в Республике Коми, расположенной на северо-востоке Европейской части России. Северная граница распространения клещей вида *I. persulcatus* на территории Республики Коми четко не определена, однако известно, что в последние десятилетия произошло резкое продвижение границы к северному полярному кругу.

Данных по обнаружению KEMV на данной территории нет, поэтому **целью** данного исследования являлось выявление и определение нуклеотидной последовательности РНК вируса Кемерово.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**: создание коллекции ДНК/кДНК из клещей *I. persulcatus*, отловленных на территории Республики Коми; скрининг исследуемых образцов на наличие генетического материала KEMV с использованием ПЦР в режиме реального времени; определение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена РНК зависимой РНК полимеразы с целью генотипирования выявленных изолятов; проведение филогенетического анализа.

Материалы и методы

Отлов клещей проводился сотрудниками ФГУП «Дезинфекция» Роспотребнадзора, г. Сыктывкар как описано нами ранее [Kartashov et al., 2017]. В исследование было взято 380 клещей вида *I. persulatus*, собранных с растительности в южных и центральных районах Республики Коми, где наиболее часто регистрируются случаи присасывания клещей (151 особей в 2013 г, 125 в 2014 г, 104 в 2015 г.; самки – 185, самцы – 174, нимфы – 21). Гомогенизация клещей осуществлялась с использованием лабораторного гомогенизатора Tissue Lyser (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот осуществлялось методом фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора («Литех», Россия) согласно инструкции производителя. Реакция обратной транскрипции проводилась набором «Реверта-100» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Первичный скрининг клещей на наличие генетического материала KEMV проводили с помощью ПЦР в режиме реального времени [Dedkov et al., 2014]. Генотипирование выявленных изолятов KEMV осуществлялось амплифицированием фрагмента сегмента 1 KEMV (260 п.н.) с помощью разработанной нами пары праймеров. Секвенирование продуктов амплификации проводили по обоим

цепям модифицированным методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы UniproUGENE v. 1.27.

Результаты исследования

При скрининге 380 образцов от клещей было выявлено 3 положительных пробы, содержащих генетический материал KEMV. Таким образом, уровень инфицированности клещей *I. persulcatus* на территории Республики Коми составил $0,8 \pm 0,2$ %. Все клещи, в которых был выявлен KEMV, являлись самками. Видовая принадлежность клещей, инфицированных вирусом Кемерово, была дополнительно подтверждена путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента гена цитохромоксидазы, локализованного в митохондриальном геноме клеща [Mikryukova et al., 2016].

Для выявленных изолятов KEMV были определены нуклеотидные последовательности фрагмента сегмента 1, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. На основании полученных данных было построено филогенетическое дерево (рис. 1) и проведено сравнение с известными последовательностями вируса Кемерово, депонированными в международной базе данных GenBank NCBI, а также с нуклеотидными последовательностями других близкородственных вирусов, входящих группу вируса Грейт-Айленд. Результаты филогенетического анализа подтвердили принадлежность выявленных изолятов к KEMV. Изоляты KEMV, циркулирующие на территории Республики Коми, формируют отдельную ветвь в пределах клады, сформированной прототипными штаммами KEMV.

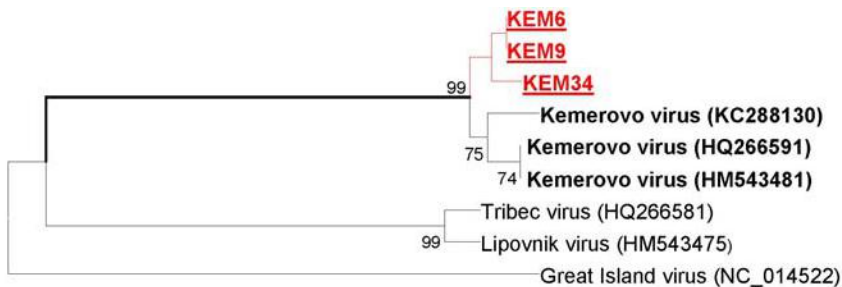


Рис. 1. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей фрагмента 1 сегмента генома KEMV (280 п.н.). Жирным красным шрифтом с подчеркиванием выделены изоляты, полученные в данной работе. Филогенетический анализ проведен с использованием статистической модели замен Джукса-Кантора. Дерево построено с использованием алгоритма NJ. Статистическая достоверность топологии установлена за счет 1000 бутстрэп-повторов

Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей, выявленных изолятов КЕМV в сравнении с известными последовательностями вируса Кемерово (HQ266591 и HM543481) составил 94 %. Уровень гомологии изолята КЕМ34 с изолятом из Кемеровской области (KC288130) составил порядка 93 %, соответствующий показатель для изолятов КЕМ6 и КЕМ9 – 93 %.

Заключение

В работе описано обнаружение РНК вируса Кемерово в клещах *I. persulcatus*, собранных на территории Республики Коми. Секвенирование фрагмента гена вирусной РНК зависимой РНК полимеразы показало, что выделенные изоляты отличаются между собой и отличаются от уже известных последовательностей КЕМV. По всей вероятности, они могут быть представителями новой генетической группы этого вида вирусов. Выявление новых геновариантов КЕМV на севере европейской части России показывает, что КЕМV распространен существенно более широко, чем было принято считать ранее. С учетом слабой изученности этого вируса, высокого потенциала генетической изменчивости и способности вызывать заболевание человека следует признать, что требуется дальнейшее и незамедлительное изучение вируса Кемерово.

Литература

1. Dedkov V.G., Markelov M.L., Gridneva K.A., Bekova M.V., Gmyl A.P., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G., Romanova L.Iu., Pogodina V.V., Yakimenko V.V. Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation. Ticks and Tick-borne Diseases, 2014; 5: 651–655.
2. Kartashov M.Yu., Glushkova L.I., Mikryukova T.P., Korabelnikov I.V., Egorova Y.I., Tupota N. L., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Ternovoi V.A., Loktev V.B. Detection of *Rickettsia helvetica* and *Candidatus R. tarasevichiae* DNA in *Ixodes persulcatus* Ticks Collected in Northeastern European Russia (Komi Republic) Ticks Tick Borne Dis., 2017; 8(4): 588–592.
3. Mikryukova T.P., Romanenko V.N., Chausov E.V., Konovalova S.N., Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Kononova Y.V., Korobitsyn I.G., Moskvitina N.S., Loktev V.B. Complete mitogenome of the ixodid tick *Ixodes pavlovskyi* (Acari: Ixodida). Mitochondrial DNA A DNA MappSeq Anal. 2016; 27(1): 407–408.
4. Tkachev S.E., Tikunov A.Yu., Babkin I.V., Livanova N.N., Livanov S.G., Panov V.V., Yakimenko V.V., Tansev A.K., Taranenko D.E., Tikunova N.V. Occurrence and genetic variability of Kemerovo virus in Ixodes ticks from different regions of Western Siberia, Russia and Kazakhstan. Genetics and Evolution. 2017; 47: 56–63.

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЗАРАЖЕННОСТИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ

A STUDY OF THE INFECTION LEVEL WITH THE HEPATITIS C VIRUS OF HIV INFECTED PATIENTS IN THE NOVOSIBIRSK REGION

А.И. Кузнецов^{1,2}, Е.И. Кривошеина^{1,2}, Е.В. Чуб¹, М.Ю. Карташов¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

² ФГБОУ ВО «Новосибирский ГАУ»

A.I. Kuznetsov^{1,2}, E.I. Krivosheina^{1,2}, E.V. Chub¹, M.Yu. Kartashov¹

¹ SRC VB «Vector» Rospotrebnadzora

² FSBEI HE «Novosibirsk SAU», Russia

Аннотация

В исследованных образцах генетического материала, полученного от ВИЧ-инфицированных пациентов в Новосибирской области, были выявлены первый, второй и третий генотипы вируса гепатита С. Уровень зараженности для первого генотипа составил $57,5 \pm 1,4$ %, для второго – $2,7 \pm 0,4$ %, для третьего – $39,8 \pm 1,3$ %. Общий уровень зараженности гепатитом С ВИЧ-инфицированных пациентов составил $45,3 \pm 0,9$ %.

Abstract

The first, second and third genotypes of the hepatitis C virus were identified in the examined samples of genetic material obtained from HIV infected patients in the Novosibirsk region. The infection level for the first genotype was $57,5 \pm 1,4$ %, for the second genotype – $2,7 \pm 0,4$ %, for the third genotype – $39,8 \pm 1,3$ %. The overall level of hepatitis C infection was $45,3 \pm 0,9$ %.

Введение

Вирус гепатита С (далее ВГС) – это небольшой оболочечный вирус с диаметром сферических вирусных частиц 55-65 нм, содержащий одноцепочечную (+)РНК, являющийся единственным видом рода *Hepacivirus* в составе семейства *Flaviviridae*. Вирус поражает клетки печени, вызывает заболевание, отличающееся часто бессимптомным вначале течением и высокой степенью

хронизации инфекции, которая может варьировать по степени тяжести от легкого заболевания, продолжающегося несколько недель, до серьезного состояния, приводящего к развитию цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы.

На сегодняшний день в мире зарегистрировано более 71 млн. ВГС-инфицированных людей. Ежегодно около 1,75 млн. людей приобретают эту инфекцию, что превышает и число смертей от ВГС-ассоциированных заболеваний (399 тыс.), и число выздоравливающих (843 тыс.). Это означает, что общее число инфицированных ВГС только возрастает год от года. Самый высокий уровень заболеваемости на данный момент регистрируется в Европе и в восточном средиземноморье (Hutin, 2017). Среди способов заражения ВГС лидируют наркомания и применение нестерильных медицинских приборов, в первую очередь шприцев. Группу риска передачи ВГС в основном составляет значительная часть населения в возрасте от 25 до 30 лет, так как гепатит С считается заболеванием, ассоциированным с наркоманией и промискуитетным поведением (Duberg и др, 2011).

Пути передачи ВГС аналогичны для ВИЧ, поэтому достаточно часто встречаются случаи коинфицирования этими вирусами. Из 36,7 млн. ВИЧ-инфицированных людей во всем мире, более 2,3 млн. (6,3 %) являются носителями ВГС (из них 1,36 млн. употребляют наркотики). Результаты некоторых исследований свидетельствуют о повышении вероятности развития и возможности ухудшения последствий ВГС-ассоциированных заболеваний печени при коинфицировании ВГС/ВИЧ. Иммуносупрессия, вызванная ВИЧ, повышает шансы развития цирроза у ВГС-инфицированных людей в 3-5 раз, а также ускоряет течение ВГС-ассоциированных заболеваний печени. При коинфицировании ВГС/ВИЧ, в возрасте после 20 и после 30 лет степень фиброза при циррозе печени составляет 16–28 % и 40–59 % соответственно, что в 2,1 – 2,5 раз больше, чем в случае моноинфицирования ВГС (Fatima и др., 2016).

Опубликованы комплексные данные об уровне инфицирования ВГС в большинстве стран мира. По этим данным в России было зарегистрировано 4748 (3238-4960) тыс. ВГС-инфицированных людей, что составляет 3,3 % от всего населения страны. 54,9 % заражены первым генотипом, 8,1 % вторым и 36,3 % третьим. По зараженности Россия находится на 7 месте из 100 представленных стран (Blach и др, 2016).

Ранее в Новосибирской области среди ВИЧ-инфицированных людей уровень зараженности ВГС и соотношение генотипов были следующими: 41,9 % (35,8-48,0 %) – ВSG/ВИЧ-коинфицированные; 1 генотип – 49,9 %, 2 – 4,1 % и 3 – 46,1 % (Шустов, 2003).

В ряде исследований было показано, что генотип 1 может быть связан с более тяжёлым течением гепатита, быстрым развитием декомпенсированной стадии заболевания, требующей трансплантацию печени (Zein, 2000). Генотип 3 ассоциируют с более быстрым прогрессированием фиброза

(Probst и др., 2011). Стандартная схема лечения пациентов с хроническим гепатитом С – это использование пролонгированных форм интерферона- α (ИНФ- α 2a, ИНФ- α 2b) в сочетании с рибавирином. Определение генотипа вируса имеет важное клиническое значение для определения тактики терапии при лечении ВГС-инфицированных пациентов и для прогноза эффективности лечения. Пациенты, инфицированные ВГС 2 или 3 генотипа, лучше поддаются лечению, быстрее и значительно чаще достигают стойкого вирусологического ответа по сравнению с пациентами, инфицированными ВГС генотипа 1.

Цель данного исследования состояла в изучении зараженности вирусом гепатита С ВИЧ-инфицированных людей в Новосибирской области в 2016 году. Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**: выделение нуклеиновых кислот из отобранных сывороток, выявление ВГС/ВИЧ-коинфицированных образцов, определение генотипов выявленных изолятов ВГС у ВИЧ-инфицированных пациентов и анализ полученных данных.

Материалы и методы

В исследование вошли 722 образца сывороток крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих в Новосибирской области. Выделение нуклеиновых кислот производилось методом аффинной сорбции с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» («ИнтерЛабСервис»). Для постановки реакции обратной транскрипции использовался набор «Реверта-L» («ИнтерЛабСервис»). Генотипирование образцов методом ПЦР в режиме реального времени проходило в 2 этапа. Выявление ВГС-положительных образцов проводилось с использованием набора «АмплиСенс® HCV-FL» («ИнтерЛабСервис»). Для определения генотипов ВГС в выявленных образцах был использован набор «АмплиСенс® HCV-1/2/3-FL» («ИнтерЛабСервис»).

Результаты и их обсуждение

В исследование вошли 722 образца сывороток крови ВИЧ-инфицированных пациентов, для которых было произведено выделение нуклеиновых кислот и определение генотипа при помощи ПЦР в режиме реального времени. Из всей выборки 332 пробы оказались ВГС-положительными: уровень коинфицирования ВГС/ВИЧ в Новосибирской области составил $45,3 \% \pm 0,9 \%$, что на $3,4 \%$ выше, чем в 2002 году и на 39% выше, чем аналогичный показатель по всему миру. Из 332 образцов 191 был определен как первый генотип ($57,5 \%$), 9 – второй генотип ($2,7 \%$) и 132 – третий ($39,8 \%$). Распределение генотипов между собой в Новосибирской области в 2016 г., 2002 годах (ВИЧ-ассоциированные) и по всей России в 2015 г. (не ВИЧ-ассоциированные) году представлено в таблице (табл. 1).

Таблица 1

**Сравнение частоты встречаемости генотипов ВГС
в различных выборках**

	Новосибирская обл., 2016г. (Результаты данной работы)	Новосибирская обл., 2002г. (Шустов, 2002)	Среднее по всей России, 2015г. (Blach и др., 2016)
1 генотип	57,5 % ± 1,4 %	49,9 %	54,9 %
2 генотип	2,7 % ± 0,4 %	4,1 %	8,1 %
3 генотип	39,8 % ± 1,3 %	46,1 %	36,3 %

Соотношение генотипов остается примерно постоянным вне зависимости от исследуемой группы (ВИЧ-ассоциированная или нет). Уровень встречаемости первого генотипа на 7,6 % выше, чем в 2002 году и на 2,6 % выше среднего значения по стране.

Заключение

Высокий уровень коинфицирования в Новосибирской области указывает на повышенную степень хронизации гепатита С в регионе и летального развития ВГС-ассоциированных заболеваний печени. В группе ВИЧ-инфицированных людей доминирование первого генотипа ВГС сохраняется, а частота его встречаемости относительно других генотипов увеличивается. Этот генотип отличается более тяжелым течением заболевания и труднее всего поддается лечению. Эпидемиологическая ситуация относительно ВГС в регионе и в целом по стране требует усиленного внимания к проблеме распространения инфекции. В первую очередь это относится к группе риска, связанной с наркоманией.

Литература

1. Zein N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. // Clin. Microbiol. Rev. 2000. № 13. С. 223–235.
2. Blach S, Zeuzem S, Manns M. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study // J. Lancet Gastroent. Hepat. 2016. № 2. С. 76–161.
3. Duberg A.S., Pettersson H., Aleman S. The burden of hepatitis C in Sweden: a national study of inpatient care // J. Viral Hepat. 2011. № 18. С. 106–118.
4. Fatima M.T., Karim Y.I. Seroprevalence of hepatitis C virus among people living with HIV/AIDS in Latin America and Caribbean: a systematic review // J. BMC Infect. Diseases 2016. С. 1–8.
5. Hutin Y., Hess S. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization // Y. Hutin 2017. 83 с.
6. Probst A., Dang T., Bochud M. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression – a systematic review and meta-analysis. // J. Viral Hepat. 2011. № 18. С. 745–759.
7. Шустов А.В. Генотипическое разнообразие изолятов и молекулярная вариабельность вируса гепатита С у населения Новосибирской области: автореф. дис. к.б.н. (03.00.03) // Шустов А.В. Кольцово, 2003. 209 с.

**АНТИСМЫСЛОВОЙ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЙ
ОЛИГОНУКЛЕОТИД, НАПРАВЛЕННЫЙ НА СЕГМЕНТ 2 ВИРУСА
ГРИППА А, ПОДАВЛЯЕТ РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА *IN VITRO* ***

AN ANTISENSE PHOSPHORYL GUANIDINIC OLIGONUCLEOTIDE,
TARGETING INFLUENZA A SEGMENT 2, INHIBITS VIRAL
REPLICATION *IN VITRO*

А.В. Марков, М.С. Купрюшкин, Р.Н. Амирханов, Е.П. Гончарова,
О.В. Марков, Е.Б. Логашенко, Т.В. Абрамова, С.В. Васильева,
В.Н. Сильников, Д.А. Стеценко, Д.В. Пышный, М.А. Зенкова

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

A.V. Markov, M.S. Kupryushkin, R.N. Amirkhanov, E.P. Goncharova,
O.V., Markov, E.B. Logashenko, T.V. Abramova, S.V. Vasil'eva,
V.N. Silnikov, D.A. Stetsenko, D.V. Pyshyi, M.A. Zenkova

e-mail: andmrkv@gmail.com

Аннотация

Идентифицирована перспективная последовательность антисмыслового олигонуклеотида, эффективно ингибирующего репликацию вируса гриппа А *in vitro*, и показано, что введение в его остов морфолиновой и фосфорилгуанидиновой модификаций, определяющих нуклеазоустойчивость аОН, значительно усиливает его противовирусный эффект.

Abstract

Promising sequence of antisense oligonucleotide (aON) that effectively inhibits replication of influenza A virus was identified. It was found that introduction into aON backbone morpholine and phosphoryl guanidine moieties gives nuclease resistance to modified aON and significantly increases its antiviral effect.

* Работа выполнена при поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (стипендия СП-1958.2015.4, грант № НШ-7623.2016.4, мегагрант № 14.B25.31.0028).

На сегодняшний день для лечения гриппозной инфекции используется ограниченный ряд лекарственных агентов – ингибиторы М2 ионного канала (римантадин, амантадин) и ингибиторы нейраминидазы (занамивир, осельтамивир). Высокая мутационная изменчивость вируса гриппа А (ВГА) способствует появлению штаммов вирусов резистентных к действию вышеуказанных препаратов. Поэтому поиск и разработка новых высокоактивных лекарственных агентов, селективно подавляющих развитие ВГА, является актуальной задачей. Одним из перспективных направлений в данной области является создание антисмысловых олигонуклеотидов (аОН), направленных на консервативные участки генома вируса, блокирующих экспрессию вирусных белков в результате стерической блокировки РНК-мишени или ее ферментативного расщепления РНКазой Н.

Целью настоящей работы является создание нового класса высокоэффективных противогриппозных аОН, несущих фосфорилгуанидиновую модификацию. На основе анализа литературных данных и собственного дизайна с использованием интернет-ресурсов RNAstructure и Oligoanalyzer Tool нами был проведен поиск наиболее оптимальных РНК-мишеней аОН в геноме ВГА. Всего было выявлено 17 перспективных участков, к которым в Лаборатории медицинской химии (ИХБФМ СО РАН) было синтезировано 34 антисмысловых олигодезоксирибонуклеотида (17 аОН – к (+) цепи вирусной РНК, 17 – к (-) цепи вирусной РНК). В результате проведенного скрининга противовирусной активности данных аОН *in vitro* на модели вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) / клетки MDCK было показано, что 3 из 34 синтезированных аОН (PB1-2AUG-F, PB1-2AUG-R, PB1-3AUG-R) в концентрации 20 мкМ достоверно снижали средний титр вируса в ~10 раз в опыте по сравнению с контролем. Все они были направлены на участок мРНК сегмента 2 вируса гриппа А, содержащий стартовый кодон AUG.

На следующем этапе скрининга были синтезированы нуклеазоустойчивые аналоги трех выявленных аОН-лидеров путем замены их сахарофосфатного остова на морфолин-содержащий остов (синтез проводился в Лаборатории органического синтеза ИХБФМ СО РАН). Исследование противовирусной активности данных олигонуклеотидов показало, что лишь один из исследованных морфолиновых аОН, направленный на участок 13-33 н. мРНК сегмента 2 (PB1-2AUG-R), обладал в концентрации 20 мкМ выраженной противогриппозной активностью *in vitro*, снижая титр вируса в опыте в 40 раз по сравнению с контролем. В случае с PB1-2AUG-F и PB1-3AUG-R введение морфолиновой модификации приводило к утрате их противовирусной активности.

Далее на основе выявленной на втором этапе скрининга последовательности лидерного PB1-2AUG-R в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН был синтезирован его фосфорилгуанидиновый аналог PhG-PB1. Было показано, что PhG-PB1 в концентрации 10 мкМ достоверно подавлял репликацию вируса гриппа А, приводя к десятикратному снижению его титра по сравнению с контролем.

Отметим, что введение фосфорилгуанидиновой модификации в структуру олигонуклеотидов приводит к исчезновению отрицательного заряда у данных молекул, в результате чего трансфекция клеток данными аОН значительно затрудняется. С целью создания аналога PhG-PB1, способного проникать в клетки без применения трансфекционных протоколов, в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН был синтезирован FAM-меченный конъюгат PhG-PB1 с тремя додецильными группировками (3Dcyl-PB1). Было показано, что 3Dcyl-PB1 в концентрации 1 мкМ способен проникать внутрь клеток MDCK без использования дополнительных трансфектантов – уже после 1 ч инкубации наблюдалась трансфекция 99 % клеток исследуемым аОН. При измерении интенсивности флуоресценции было выявлено, что накопление 3Dcyl-PB1 внутри клеток MDCK происходит в течение первых четырех часов инкубации с максимумом в точке 4 ч (12,4 RFU), после чего клетки начинают избавляться от додецил-содержащих олигонуклеотидов. В результате использования панели селективных ингибиторов клеточного транспорта было выявлено, что 3Dcyl-PB1 проникает внутрь клеток при помощи caveоло-опосредованного эндоцитоза и макропиноцитоза. Проведенные пилотные исследования противовирусной активности 3Dcyl-PB1 *in vitro* показали, что, несмотря на значительное накопление данного аОН внутри клеток, концентрации 3Dcyl-PB1 1 мкМ недостаточно для достижения выраженного противовирусного эффекта.

Таким образом, разработанный фосфорилгуанидин-содержащий аОН PhG-PB1 представляет собой перспективный противогриппозный агент. Присоединение к данному олигонуклеотиду липофильных заместителей способствует значительному усилению проникновения полученного конъюгата 3Dcyl-PB1 внутрь клеток, однако противовирусный потенциал данного аОН требует дальнейшего исследования.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА *BOERHAVIA DIFFUSA* В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

INVESTIGATION OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF *BOERHAVIA DIFFUSA* EXTRACT ON BOVINE VIRUS DIAREY VIRUS

А.А. Никонова, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский
федеральный научный центр агробиотехнологий Российской
академии наук, Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока, Россия*

Аннотация

Представлены результаты исследования токсичности и противовирусной активности растительного экстракта *Boerhavia diffusa* в отношении возбудителя вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота 1 типа *in vitro*. Максимально переносимая концентрация препарата для культуры клеток КСТ составила 125 мкг/см³. Установлено, что исследуемый экстракт обладает выраженной противовирусной активностью в отношении вируса вирусной диареи крупного рогатого скота.

Annotation

The results of a study of the toxicity and antiviral activity of the plant extract of *Boerhavia diffusa* to bovine viral diarrhea virus type 1 *in vitro* are presented. The maximum tolerable concentration of the drug for the CST cell culture was 125 µg / cm³. It was found that the extract had a pronounced antiviral activity against the bovine viral diarrhea virus.

Вирус вирусной диареи-болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота (BVDV) принадлежит к роду *Pestivirus*, семейству *Flaviviridae*. Он вызывает многообразие клинических форм инфекции, приводя к значительным экономическим потерям в мясном и молочном животноводстве во всем мире [1-3]. Кроме этого вирус является контаминантом биологических препаратов. В некоторых странах инструментом контроля инфекций, вызываемых вирусом, является вакцинация, основанная на применении живых и инактивированных вакцин с различной эффективностью. Проти-

вовирусные соединения представляют собой потенциальную меру борьбы в случаях недостаточной эффективности вакцин. Их преимущество в борьбе с BVDV инфекцией заключается в способности обеспечить немедленную защиту у животных групп риска в случае вспышки болезни. В настоящее время нет доступных коммерческих препаратов, высоко эффективных и широко применяемых при вирусных инфекциях КРС. Поэтому поиск новых соединений, обладающих противовирусной активностью в отношении BVDV является актуальным. Целью данной работы стало изучение противовирусной активности растительного экстракта *Boerhavia diffusa* в отношении BVDV.

Материалы и методы. Работа выполнена в лаборатории биотехнологии – диагностический центр ИЭВСиДВ СФНЦА РАН с использованием переливаемой линии культуры клеток коронарных сосудов теленка (КСТ) и штамма «БК-1» BVDV.

Культивирование клеток проводили во флаконах для клеточных культур (TPP, Швейцария) с использованием среды Игла MEM с L-глутамином (ООО «БиолоТ»), эмбриональной сыворотки крови теленка (HyClone).

Изучали противовирусную активность экстракта *Boerhavia diffusa*, производства «Sri Jain Ayurvedic Pharmacy» (серия партии № PN001). Для получения стерильных растворов использовали бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (TPP, Швейцария).

Токсичность экстракта *Boerhavia diffusa* для культуры клеток КСТ оценивали в 96-луночных культуральных планшетах. При формировании монослоя культуры клеток, в лунки планшета вносили среду Игла MEM, содержащую десятикратные разведения экстракта (от 10^{-1} до 10^{-7}). Максимальную переносимую концентрацию (МПК) препарата определяли по формуле: $МПК = ТЦД_{50}/4$, где $ТЦД_{50}$ – это минимальная концентрация препарата, вызывающая цитопатический эффект в 50 % монослоя.

При определении профилактической активности препарат в МПК вносили в монослой культуры клеток за час до вируса, а лечебной – через 1 ч. после вируса. При изучении вирулицидной активности 0,5 мл экстракта в МПК добавляли к 0,5 мл суспензии вируса с установленной инфекционной активностью и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °C и 0,5 % CO_2 . После инкубации полученную смесь вируса и препарата вносили в монослой культуры клеток.

В качестве контроля во всех случаях использовали культуру клеток без препарата. Планшеты инкубировали при температуре 37 °C и 0,5 % CO_2 в течение 72 часов. Затем образцы в планшетах подвергали циклу

заморозки-оттаивания и титровали для определения инфекционной активности вируса.

Степень редукции вируса определяли по формуле:

$$R = (\log_{10} A_0) - (\log_{10} A_n),$$

где A_0 – титр вируса в исходном образце; A_n – его титр в пробе после обработки препаратом. Противовирусный эффект считали значимым при снижении титра на 1,7 – 2,0 log.

Результаты исследования. МПК экстракта *Boerhavia diffusa* составила 125 мкг/см³. Результаты изучения противовирусной активности препарата представлены в таблице.

Таблица

**Противовирусная активность экстракта *Boerhavia diffusa*
в отношении BVDV *in vitro***

№ п./п.	Противовирусная активность	Контроль вируса $\log_{10}$ ТЦД _{50/см³}	Титр вируса после инкубации с препаратом $\log_{10}$ ТЦД _{50/см³}	Уровень редукции вируса $\log_{10}$ ТЦД _{50/см³}
1	Вирулицидная	7,67±0,08	5,42±0,22	2,25
2	Профилактическая		6,58±0,08	1,09
3	Лечебная		6,50±0,25	1,17

Инкубация штамма «БК-1» BVDV с экстрактом *Boerhavia diffusa* в течение 1 часа приводила к снижению его инфекционной активности на 2,25 $\log_{10}$ по сравнению с контролем. У тестируемого соединения выявлено незначительное профилактическое и лечебное действие.

Установлено, что экстракт *Boerhavia diffusa* обладает вирулицидной активностью по отношению к BVDV *in vitro*. Требуется дальнейшее изучение его противовирусной активности *in vivo*, а также – возможности извлечение и концентрирование соединений, входящих в состав экстракта *Boerhavia diffusa* для усиления противовирусного действия препаратов на их основе.

Литература

1. Глотов А.Г. Вирусная диарея: значение в патологии воспроизводства крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова // Ветеринария. 2015. № 4. С. 3–8.
2. Глотов А.Г. Пестивиролы жвачных животных / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.Ф. Шуляк // Вопросы вирусологии. 2016. Т. 61. № 2. С. 59–62.
3. Vilcek S. Genetic clustering of bovine viral diarrhea viruses in cattle farms: genetic identification and analysis of viruses directly from cattle sera / S. Vilcek, S. Alenius, D.J. Paton et al. // Veterinary Journal. 1999. Vol. 158. P. 33–38.

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ГРИППА В ПОПУЛЯЦИЯХ СВИНЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОГО КАЗАХСТАНА В 2013–2016 ГГ.

CIRCULATION OF THE INFLUENZA VIRUS IN POPULATIONS OF PIGS ON THE TERRITORY OF EASTERN KAZAKHSTAN IN 2013–2016

Н.С. Онгарбаева, Г.В. Лукманова, С.Б. Байсейіт,
М.Г. Шаменова, Н.Г. Кливлеева

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

N.S. Ongarbayeva, G.V. Lukmanova, S.B. Baiseit,
M.G. Shamenova, N.G. Klivleyeva

Institute of Microbiology and Virology – CS MES, Republic of Kazakhstan

e-mail: biochem_vir@mail.ru

Аннотация

В эпидемические периоды 2013–2016 гг. в животноводческих хозяйствах Восточного Казахстана от свиней собрано 230 носоглоточных смывов и 70 сывороток крови. При первичном заражении и последующих пассажах на куриных эмбрионах выделено 3 изолята вируса гриппа А с антигенной формулой H1N1. Данные серологических исследований 70 сывороток крови в реакции торможения гемагглютинации показали, что антитела выявлялись к возбудителю сезонного гриппа А/H1N1 и А/H3N2.

Abstract

In the epidemic periods 2013–2016 230 nasopharyngeal swabs and 70 blood serums were collected from pigs in livestock farms of Eastern Kazakhstan. 3 viruses of the influenza with the antigenic formula A/H1N1 isolated at primary inoculation and subsequent passages on chick embryos. Serological studies data of 70 serum in the hemagglutination inhibition reaction detected the antibodies to the causative agent of seasonal influenza A/H1N1 and A/H3N2.

Вирусы гриппа типа А являются уникальными среди возбудителей инфекционных заболеваний как людей, так и целого ряда млекопитающих (лошадей, свиней, китов, тюленей и др.) и птиц. В связи с тем, что свиньи

восприимчивы к вирусам гриппа А птиц и человека, они считаются промежуточным хозяином, в котором происходит реассортация генов между птичьими, свиными и человеческими вирусами. Реассортация способствует возникновению новых антигенных вариантов вируса гриппа, способных вызывать эпидемии, пандемии и эпизоотии. В связи с этим изучение особенностей циркуляции вирусов гриппа в свиной популяции необходимо для проведения своевременных противоэпидемических и противоэпизоотических мероприятий.

С целью изоляции вируса гриппа с 2013 по 2016 гг. в крестьянских животноводческих хозяйствах Восточно-Казахстанской области от свиней проведен сбор 230 смывов и 70 сывороток крови.

При первичном скрининге носоглоточных смывов в РТ-ПЦР, проведенный с использованием реагентов «АмплиСенс» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (Россия, Москва), выявлено 112 образцов (48,7 %), содержащих РНК вируса гриппа типа А/Н1.

В результате первичного заражения и последующих пассажей на 9–11-дневных куриных эмбрионах ПЦР-положительных проб выделено шесть гемагглютинирующих агентов с титрами гемагглютинации 1:4–1:16. В ходе последовательных пассажей титры трех изолятов А/свинья/Усть-Каменогорск/20/14, А/свинья/Усть-Каменогорск/21/14 и А/свинья/Усть-Каменогорск/23/14 удалось повысить до 1:512 – 1:1024.

Анализ популяционного иммунитета осуществляли исследованием 70 сывороток крови в ИФА и РТГА. ИФА проводили с использованием тест-системы производства ООО «ППДП» (г. Санкт-Петербург) к вирусу гриппа типа А подтипов Н1Н1 и Н3Н2. РТГА – с референсными штаммами: А/Айова/15/30 (Hsw1N1), А/Калифорния/07/09 (H1N1v) и А/Висконсин/67/05 (H3N2).

Результаты ИФА показали, что антитела к вирусу гриппа А/Н1Н1 обнаружены в пяти пробах (7 %), к А/Н3Н2 – в трех образцах (4,3 %). В РТГА антитела к вирусу гриппа А/Н1Н1 выявлены в пяти образцах (7 %). Титры антител составили 1:80–1:160. Одна проба (1,4 %) оказалась серопозитивной по отношению к вирусу гриппа А/Н3Н2, антитела отмечены в титрах 1:20–1:40.

Таким образом в результате первичного скрининга биологических образцов в РТ-ПЦР, изоляции вирусов на КЭ и серологических исследований в РТГА и ИФА установлено, что в 2013–2016 гг. на территории Восточного Казахстана среди свиного поголовья наблюдалась циркуляция вируса гриппа А с антигенными формулами Н1Н1 и Н3Н2, с преобладанием вируса подтипа А/Н1Н1.

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАЗАХСТАНСКОГО ШТАММА
А/КЫЗЫЛОРДА/185/15 К РЕМАНТАДИНУ
В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK И НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ**

SENSITIVITY OF THE KAZAKHSTAN STRAIN
A/KYZYLORDA/185/15 TO REMANTADINE
IN THE CULTURE OF MDCK CELLS AND IN CHICKEN EMBRYOS

Н.С. Онгарбаева, Л.К. Амирасшева, Г.В. Лукманова,
Н.Т. Сактаганов, Т.И. Глебова, Н.Г. Кливлеева

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

N.S. Ongarbayeva, L.K. Amirasheva, G.V. Lukmanova,
N.T. Saktaganov, T.I. Glebova, N.G. Klivleyeva

*Institute of Microbiology and Virology – CS MES,
Republic of Kazakhstan*

e-mail: biochem_vir@mail.ru

Аннотация

Представлены результаты изучения чувствительности казахстанского штамма вируса гриппа А/Кызылорда/185/15, выделенного в Аральском регионе, по отношению к ремантадину в культуре клеток MDCK и на куриных эмбрионах. Данный штамм проявил чувствительность к ремантадину как в культуре клеток MDCK, так и на куриных эмбрионах.

Abstract

There are the results of the study of sensitivity to remantadine of Kazakhstan strain of influenza virus A/Kyzylorda/185/15, isolated in Aral region in 2015. This strain showed sensitivity to remantadine in MDCK cell culture and chicken embryos.

Грипп является одной из наиболее актуальных медицинских и социальных проблем во всем мире. Высокая мутационная изменчивость вирусов гриппа обуславливает стремительное распространение штаммов с генетическими признаками резистентности к противовирусным препаратам.

Целью данной работы являлось изучение чувствительности казахстанского штамма вируса гриппа А/Кызылорда/185/15 к различным концентрациям противовирусного препарата ремантадина, производного адамантана – блокатора ионных каналов, образуемых вирусным белком М2. Чувствительность оценивалась по уровню подавления репродукции вируса в культуре клеток MDCK и на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Дозу препарата, подавляющую титр вируса в реакции гемагглютинации в два раза по сравнению с контролем (без препарата), считали ингибирующей концентрацией.

Для определения 50 %-ной эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД₅₀) и 50 % тканевой цитопатической инфекционной дозы (ТЦИД₅₀) вирусы титровали на 9-дневных РКЭ и в культуре клеток MDCK соответственно. О наличии вируса в РКЭ судили в реакции гемагглютинации (РГА), в культуре клеток MDCK, помимо РГА, вычислением цитопатического действия. Величины ЭИД₅₀ и ТЦИД₅₀ рассчитывали по методу Reed L. и Muench H.

Установлено, что инфекционная активность штамма на культуре клеток составила 3,48 lgТЦИД_{50/0,2мл} и на РКЭ – 6,48 lg ЭИД_{50/0,2мл}.

Показано, что ремантадин в концентрации 3,44 мкг/мл подавляет способность вируса гриппа А/Кызылорда/185/15 вызывать цитопатическое действие в монослое культуры клеток MDCK после 48 часов инфицирования. На РКЭ ингибирующая концентрация составила 12,5 мкг/мл. Все это указывает на чувствительность штамма вируса гриппа А/Кызылорда/185/15 к ремантадину.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А

DESIGN OF A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF RECEPTOR SPECIFICITY OF INFLUENZA A VIRUSES

Г.С. Онхонова, С.В. Мальцев, А.Б. Рыжиков

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

G.S. Onkhonova, S.V. Maltsev, A.B. Ryzhikov

SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Предметом изучения данной работы является аффинность связывания вирусов гриппа с моделями клеточных рецепторов. Параметром, характеризующим аффинность, является константа диссоциации. Цель данной работы – разработка и оптимизация количественного метода измерения рецепторной специфичности вируса гриппа. В ходе работы было проведено сравнение трех методов количественного определения рецепторной специфичности штаммов вируса гриппа – метода Диксона в прямых координатах, метода с использованием параметра IC₅₀ и кинетического метода. Отработанные методы были опробованы для нескольких штаммов вируса гриппа А: A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/Anhui/01/2013 (H7N9), A/California/7/2009 (H1N1pdm09). Полученные данные могут быть использованы для своевременного выявления новых потенциально опасных для человека штаммов вируса гриппа.

Annotation

The subject matter of this work is affinity of binding of influenza viruses to models of the cell receptor. Affinity parameter is dissociation constant. The study aim is design and optimization of a quantitative method for measuring receptor specificity of the influenza viruses. During the work three methods for quantitative determination of receptor specificity of strains of influenza viruses were compared: Dixon method in direct coordinates, method of estimation of IC₅₀, kinetic method. Developed methods have been tested for several strains of influenza viruses: A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/Anhui/01/2013 (H7N9), A/California/7/2009 (H1N1pdm09). The obtained results can be used for the timely detection of new potentially dangerous strains of influenza viruses for human.

Введение

Грипп – это острая вирусная инфекция, циркулирующая по всему миру, которая может заражать млекопитающих, птиц и людей, является одной из основных причин заболеваемости и смертности. В процессе жизненного цикла вирионы проходят обязательную стадию – прикрепление к поверхности клетки-мишени. Для вируса гриппа это происходит за счет связывания гемагглютинина со специфическими рецепторами – гликолипидами или гликопротеинами, которые содержат терминальные сиалированные фрагменты (в основном N-ацетилнейраминовая кислота). Структурное различие терминальных сиалированных фрагментов, прикрепленных к гликановым цепям, является основой определения специфичности связывания рецепторов. Существует две основные химические формы сиаловой кислоты ($\alpha 2,3$ и $\alpha 2,6$) и разные штаммы вируса гриппа отличаются сродством к ним. Штаммы вируса птичьего гриппа используют в качестве рецепторов сиаловые кислоты со связью $\alpha 2,3$. Штаммы вируса человеческого гриппа преимущественно прикрепляются к сиаловым кислотам со связью $\alpha 2,6$. Но возникают ситуации, когда штамм вируса птичьего гриппа может инфицировать человека. В этом случае течение болезни очень осложняется.

Кинетика взаимодействия вируса гриппа с клеточными рецепторами

Кинетика взаимодействия вируса гриппа с рецепторами может быть описана кинетикой лиганд-рецепторного взаимодействия, для которой выражение равновесной концентрации образовавшегося комплекса:

$$[LR] = \frac{[R]_0[L]_0}{k_d + [L]_0} (1 - e^{-(k_+[L]_0+k_-)}) \quad (1)$$

где $[R]_0$ – общая концентрация рецепторов, $[L]_0$ – общая концентрация лигандов, $[LR]$ – концентрация комплексов лиганд-рецептор, $k_d = \frac{k_-}{k_+}$ – равновесная константа диссоциации лиганд-рецепторных комплексов.

Уравнение (1) можно переписать в виде:

$$LR = A(1 - e^{-k\tau}) \quad (2)$$

где $k = k_+[L]_0 + k_-$, $A = \frac{[R]_0[L]_0}{k_d + [L]_0}$.

Если построить зависимость концентрации лиганд-рецепторных комплексов от времени, то можно узнать значение параметра k , стоящего в показателе экспоненты (рис. 1). Далее, если k определено при двух и более концентрациях лиганда, то кинетические константы определяются регрессионными методами.

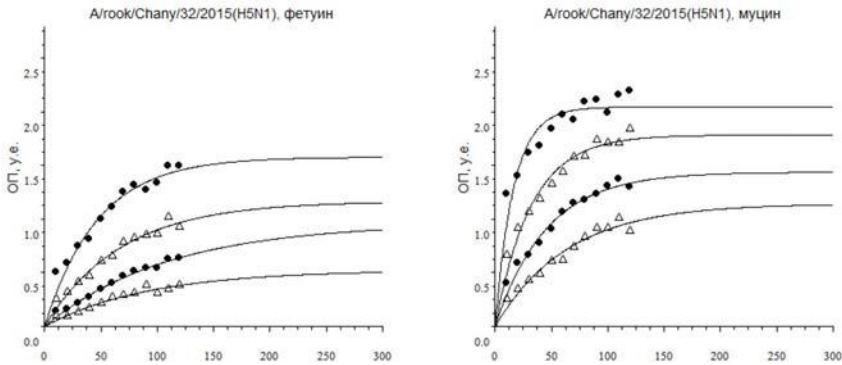


Рис. 1. Пример зависимости оптической плотности от времени

За основу теоретического метода при конкурентном связывании была взята формула:

$$[L_1R] = \frac{[R_0][L_1]_0}{[L_1]_0 + K_{d1}(1 + \frac{[L_2]_0}{K_{d2}})} \quad (3)$$

где L_1R – концентрация комплексов, пропорциональная оптической плотности, R_0 – концентрация антигена, L_{10} и L_{20} – концентрации конкурирующего и меченого белков соответственно, K_{d1} и K_{d2} – константы диссоциации немеченого и конкурирующего белков. В случае метода Диксона в прямых координатах константой диссоциации является значение абсциссы точки пересечения кривых вытеснения одного лиганда вторым (рис. 2).

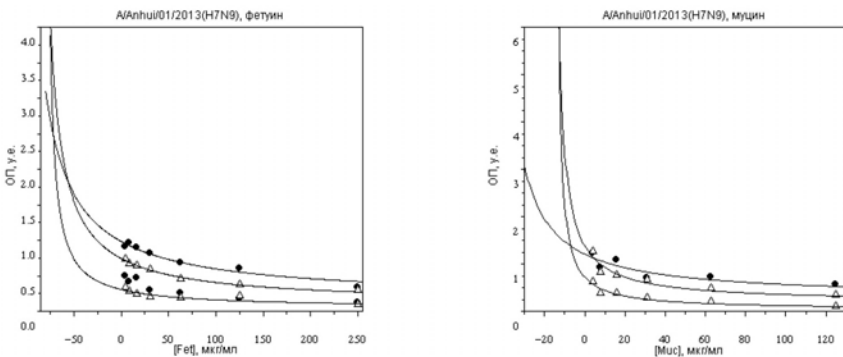


Рис. 2. Пример зависимости оптической плотности от концентрации конкурентного белка фетуина/муцина. Три кривых соответствуют трём различным разведениям биотинилированных фетуина/муцина

Используя параметр IC_{50} , константу диссоциации можно определить следующим образом:

$$K_{d_2} = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L_1]_0}{K_{d_1}}} \quad (4)$$

где IC_{50} – концентрация второго лиганда, ингибирующая связывание первого лиганда на 50 %.

Результаты

Для исследования выбрали три вирусных штамма: A/rook/Chany/32/2015 (H5N1), A/Anhui/01/2013 (H7N9), A/California/7/2009 (H1N1pdm09). В качестве модели клеточных рецепторов были использованы гликозилированные белки – фетuin и муцин, поскольку они содержат сиаловые кислоты «человеческого» $\alpha 2,6$ (Neu5Ac $\alpha 2$ -6Gal) и птичьего типов $\alpha 2,3$ (Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal). Для выбранных штаммов и модельных белков были рассчитаны значения K_d и pK_a , а также соответствующие погрешности тремя методами: методом Диксона в прямых координатах, через параметр IC_{50} и с помощью кинетического метода.

Таблица 1

**Константы диссоциации для штаммов вируса гриппа А:
A/California/7/2009 (H1N1pdm09), A/rook/Chany/32/2015 (H5N1),
A/Anhui/01/2013 (H7N9) на фетуине и муцине**

	Фетuin					
	Диксон		IC ₅₀		Кинетика	
	K_d моль/л	pK_a	K_d моль/л	pK_a	K_d моль/л	pK_a
H1N1	$2,73(\pm 0,12) \cdot 10^{-7}$	$6,56 \pm 0,02$	$1,93(\pm 0,44) \cdot 10^{-7}$	$6,71 \pm 0,1$	$8,16(\pm 7,49) \cdot 10^{-8}$	$7,09 \pm 0,4$
H5N1	$4,24(\pm 2,43) \cdot 10^{-8}$	$7,37 \pm 0,12$	$4,71(\pm 2,43) \cdot 10^{-8}$	$7,33 \pm 0,22$	$2,4(\pm 2,11) \cdot 10^{-8}$	$7,62 \pm 0,38$
H7N9	$1,36(\pm 0,01) \cdot 10^{-6}$	$5,87 \pm 0,004$	$1,78(\pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	$5,75 \pm 0,07$	$3,91(\pm 1,43) \cdot 10^{-7}$	$6,41 \pm 0,16$
	Муцин					
	Диксон		IC ₅₀		Кинетика	
	K_d моль/л	pK_a	K_d моль/л	pK_a	K_d моль/л	pK_a
H1N1	$2,53(\pm 1,21) \cdot 10^{-8}$	$7,6 \pm 0,21$	$1,01(\pm 0,05) \cdot 10^{-7}$	$6,99 \pm 0,02$	$3,46(\pm 0,8) \cdot 10^{-9}$	$8,46 \pm 0,1$
H5N1	$3,5(\pm 0,12) \cdot 10^{-7}$	$6,46 \pm 0,02$	$8,85(\pm 4,37) \cdot 10^{-8}$	$7,05 \pm 0,21$	$1,65(\pm 0,64) \cdot 10^{-9}$	$8,78 \pm 0,17$
H7N9	$1,81(\pm 0,12) \cdot 10^{-7}$	$6,74 \pm 0,03$	$2,78(\pm 1,32) \cdot 10^{-7}$	$6,56 \pm 0,21$	$1,51(\pm 0,55) \cdot 10^{-8}$	$7,82 \pm 0,16$

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СБОРКУ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ МАРБУРГ

DEVELOPMENT OF RECOMBINANT PLASMIDS THAT ASSEMBLE MARBURG PSEUDOVIRUSES

О.А. Полежаева, Д.Н. Щербаков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Россия

O.A. Polezhaeva, D.N. Scherbakov

SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Нами была проведена научно-исследовательская работа по созданию универсальных рекомбинантных плазмид, обеспечивающих сборку псевдовиральных частиц Марбург на основе лентивирусной и рабдовирусной систем. В результате нами была получена панель псевдовиральных частиц, экспонирующих на поверхности гликопротеины трех штаммов вируса Марбург. Каждый гликопротеин представлен в двух вариантах – полноразмерный и с делецией муциноподобного домена.

Abstract

The purpose of this research was to create universal recombinant plasmids that would provide assembly of Marburg pseudoviral particles on the basis of lentiviral and rhabdovirus systems. We have obtained a panel of pseudovirus particles that expose three strains of Marburg virus glycoproteins on the surface. Each glycoprotein is presented in two variants – full-length and with a deletion of the mucin-like domain.

Работа направлена на получение панели функциональных вирусоподобных частиц (ВПЧ), на основе лентивирусной системы и вируса везикулярного стоматита, псевдотипированных поверхностным гликопротеином (GP) вируса Марбург (MARV). Для получения панели были выбраны последовательности, кодирующие поверхностный гликопротеин трех штаммов: Popp, Musoke и MARV/H.sapiens-tc/COD/2000/22DRC, как отражающие крупные вспышки геморрагической лихорадки Марбург. Синтез нуклеотидных последовательностей соответствующих GP MARV осуществлен коммерческой фирмой (ДНК-синтез, Москва). Соответствие нуклеотидной последовательности заданной было подтверждено секвенированием. Полученные последовательности были клонирова-

ны в составе коммерчески доступного вектора pHMGFP. После трансформации компетентных клеток *E. coli* было проведено секвенирование рекомбинантных векторов, для подтверждения встройки последовательности, кодирующей GP. Следующим шагом стало получение вариантов GP вируса Марбург с делецией муциноподобного домена. Поскольку муциноподобный домен играет роль в уходе от иммунных реакций организма его наличие мешает точному выявлению мишеней гуморального ответа. Последовательность, соответствующая муциноподобному домену, была удалена при помощи сайт-направленного мутагенеза.

Для получения псевдовирусов на основе лентивирусной системы была проведена котрансфекция полученными плазмидами и пакующей плазмидой pSG3ΔEnv. Функциональную активность псевдовирусных частиц определяли на чувствительных клетках TZM-bl. Сигнал свечения прямо пропорционален количеству зараженных клеток и определяется в относительных люциферазных единицах (RLU). В качестве отрицательного контроля выступали неинфицированные клетки, а в качестве положительного псевдовирус ВИЧ-1, SF162.LS (табл. 1).

Таблица 1

Результаты функционального анализа полученных вариантов псевдовирусов (голубым отмечены варианты ВПЧ, вошедшие в финальную версию панели)

Плазмида	Расшифровка	Среднее значение показателя люминесценции, RLU
phGPM 2	Полноразмерный GP MARV Musoke	246 ± 328
phGPM 5		97837 ± 18667
phGPM 6		201717 ± 12168
phGPMΔMD 1	GP MARV Musoke с делецией муциноподобного домена	128262 ± 8512
phGPMΔMD 2		109230 ± 2748
phGPMΔMD 10		41172 ± 5048
phGPP 7	Полноразмерный GP MARV Popp	0
phGPP 9		65309 ± 4222
phGPP 15		224404 ± 9636
phGPPΔMD 3.1	GP MARV Popp с делецией муциноподобного домена	230474 ± 19059
phGPPΔMD 4.1		280711 ± 11301
phGPPΔMD 7.1		178106 ± 17044
phGPD 2.1	Полноразмерный GP MARV/H.sapience-tc/COD/2000/22DRC	100 ± 149
phGPD 3.1		255094 ± 13268
phGPD 4		2322 ± 410
phGPDΔMD 2	GP MARV/H.sapience-tc/COD/2000/22DRC с делецией муциноподобного домена	163570 ± 8092
phGPDΔMD 3		279182 ± 8456
phGPDΔMD 4		283585 ± 12704
phGPDΔMD 6		262996 ± 11939
SF162.LS	Положительный контроль	275289 ± 7449
Cell	Отрицательный контроль	0

Для получения псевдовирусов на основе вируса везикулярного стоматита (VSV), была проведена трансфекция полученными рекомбинантными плазмидами, а спустя сутки был внесён рекомбинантный VSV, геном которого дефектен по гену гликопротеина (G). Функциональную активность псевдовирусных частиц также определяли на чувствительных клетках TZM-bl (табл. 2).

Таблица 2

**Предварительные результаты функционального анализа
полученных вариантов псевдовирусов на основе VSV**

Плазида	Расшифровка	Среднее значение показателя люминесценции, RLU
phGPM 5	Полноразмерный GP MARV Musoke	6646 ± 2621
phGPPΔMD 9	GP MARV Popr с делецией муциноподобного домена	140488 ± 27775
phGPD 3	Полноразмерный GP MARV/H.sapience-tc/COD/2000/22DRC	116538 ± 42600
SF162.LS	Положительный контроль	173253 ± 5942
Cell	Отрицательный контроль	0

В результате проделанной работы нами была получена панель рекомбинантных плазмид, кодирующих нуклеотидную последовательность гликопротеина трех штаммов вируса Марбург и варианты плазмид, содержащие последовательность GP с делецией муциноподобного домена. С использованием полученных плазмид были получены функциональные псевдовирусы. Интересно, что варианты псевдовирусов псевдотипированные GP с делецией муциноподобного домена показывают более высокий уровень трансдукции. Полученная панель псевдовирусов Марбург может быть использована для разработки новых иммунотерапевтических и профилактических препаратов, и поиска антивирусных соединений.

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГЕРПЕСВИРУСА ЛОШАДЕЙ 1 И 4 СЕРОТИПОВ

DEVELOPMENT OF PCR TEST- SYSTEMS FOR DIAGNOSTICS EQUINE HERPES VIRUS OF SEROTYPES 1 AND 4.

С.О. Садикалиева, К.А. Шораева, Г.О. Шыныбекова,
Е.Д. Бурашев, М.Б. Орынбаев, К.Т. Султанкулова

*РГП «Научно-исследовательский институт проблем
биологической безопасности» КН МОН РК, Жамбылская область,
Кордайский район, п. г. т. Гвардейский, Республика Казахстан*

S.O. Sadikaliyeva, K.A. Shoraeva, G.O. Shynybekova,
Y.D. Burashev, M.B. Orynbayev, K.T. Sultankulova

*The research Institute for Biological Safety Problems,
Ministry of Education and Science of Republic of Kazakhstan –
Science Committee, Gvardeiskiy, Kordaiskiy rayon, Zhambylskaya oblast,
Republic of Kazakhstan*

e-mail: Sadikaliyeva86@mail.ru

Аннотация

В данной работе представлены результаты работ по разработке мультиплексной ПЦР тест-системы. Разработанная тест-система предназначена для выявления герпесвируса лошадей 1 и 4 серотипов.

Abstract

In this paper presented the results of the development of a multiplex PCR test system. This test system allows to identify Equine herpesvirus of serotypes 1 and 4 .

Для лабораторной диагностики и идентификации вирусных болезней лошадей к настоящему времени в мире разработаны и применяются различные серологические и иммунологические методы. Все эти методы имеют свою диагностическую ценность – одни из них требуют значительных затрат времени, другие имеют низкую чувствительность и специфич-

ность. Поэтому усовершенствование и разработка более чувствительных и специфичных, а также экспрессных методов лабораторной диагностики остается актуальной проблемой и до настоящего времени.

Широкое распространение в диагностике вирусных болезней лошадей получил метод ПЦР. Несмотря на некоторые ограничения он, несомненно, незаменим для ранней экспресс-диагностики, в частности, таких болезней, как грипп, ринопневмония, вирусный артериит и ряда других инфекций лошадей [1].

В последние годы ринопневмонию диагностировали в ряде стран Европы, в том числе в странах СНГ [2, 3, 4, 5]. В Казахстане встречаются возбудители двух иммунологически самостоятельных типов инфекции: герпес-вирус лошадей 1 (ГВЛ-1) и герпесвирус лошадей 4 (ГВЛ-4) серотипов, которые часто ассоциируется с респираторными заболеваниями жеребят [3].

Исходя из этого целью настоящей работы является разработка тест-системы для диагностики ГВЛ-1 и ГВЛ-4 с помощью метода мультиплексной ПЦР.

В качестве объекта исследований в работе были использованы биопробы, выделенные на территории РК с подозрением на ГВЛ, а также штаммы *Equidherpesvirus 4/KZ/2-15* и *EHV-1/KZ/2015*.

Поиск и отбор нуклеотидных последовательностей сегментов ГВЛ проводят в международной базе данных GenBank. Анализ нуклеотидных последовательностей генов или их отдельных фрагментов проводили с помощью различных пакетов компьютерных программ, таких как *VectorNTISuite 9*, *DNASISMAX 1.0*, *BioEdit 7.0*.

Конструирование праймеров для ПЦР. Конструирование праймеров проводили с помощью различных компьютерных программ, основными из которых являются *Oligo 6* и *VectorNTISuite 9*. Выделение вирусной ДНК проводили по методике с использованием СТАВ буфера. Для постановки ПЦР использован набор «*AccuPrime Taq DNA Polymerase*», фирмы *Invitrogen* (США).

В результате проведенных экспериментов для одновременной диагностики в мультиплексной ПЦР были отобраны две пары наиболее оптимальных праймеров. Мультиплексная ПЦР проведена с одновременным использованием в одной реакции праймеров для 1 и 4 серотипов ГВЛ в установленной опытным путем концентрациями при одинаковых условиях ПЦР со штаммами *Equidherpesvirus 4/KZ/2-15* и *EHV-1/KZ/2015*. В результате нарабатывались специфические ПЦР продукты – фрагменты ДНК размерами ~500 п.о. и ~240 п.о., соответственно для ГВЛ-1 и ГВЛ-4.

Разработанная мультиплексная ПЦР тест-система для обнаружения ДНК ГВЛ-1 и ГВЛ-4 были апробированы на штаммах, хранящихся в музее микроорганизмов НИИПББ и патологических материалах. Нарабатыва-

лись специфические продукты только в тех пробах, которые содержали ДНК ГВЛ-1 и ГВЛ-4.

Резюмируя полученные данные можно заключить, что в результате проведенных исследований впервые в Республике Казахстан разработана мультиплексная ПЦР тест-система, позволяющие идентифицировать ГВЛ-1 и ГВЛ-4 одновременно в исследуемых пробах.

Разработанная ПЦР тест-система для диагностики ГВЛ-1 и ГВЛ-4 может использоваться для скрининга большого количества проб на выявление ГВЛ. При этом, в сравнении с классическими методами время анализа сокращается в десятки раз и позволяет проводить анализ непосредственно в небольших ветеринарных лабораториях, избегая транспортировки образцов.

Литература

1. Office International des Epizooties. Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 2010 (www.oie.int).
2. OIE—World organization for animal health / World Animal ealth Information Database (WAHID) Interface.
3. Patel J.R., Heldens J. Equine herpesviruses 1 (EHV-1) and 4 (EHV-4) epidemiology, disease and immunoprophylaxis: a brief review // Vet J. 2005. Vol. 170, № 1. P. 14–23.
4. Taouji S., Collobert C., Gicquel B., Sailleau C., Brisseau N., Moussu C., Breuil M.F., Pronost S., Borchers K., Zientara S. Detection and isolation of equine herpesviruses 1 and 4 from horses in Normandy: an autopsy study of tissue distribution in relation to vaccination status // J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2002. Vol. 49, № 8. P. 394–399.
5. Gur S., Yapici O. Equine Herpesvirus type 1 and 4 in Individually Reared Horses in Central and Western // Acta Vet. Brno. 2008. Vol. 77. P. 609–613.

ВИРУСЫ ХЕНДРА И НИПАХ**HENDRA AND NIPAH VIRUSES**

Н.П. Сачивкина

*Российский университет дружбы народов,
Москва, Россия*

N.P. Sachivkina

*Russian peoples friendship University,
Moscow, Russia*

e-mail: sachivkina@yandex.ru

Аннотация

О вирусе Эбола, вызывающем крайне тяжелую геморрагическую лихорадку с коэффициентом летальности до 90 процентов, слышали практически все. А вот названия Хендра и Нипах, вызывающие респираторный и неврологический синдромы с таким же высоким процентом смертности, знакомы немногим. Цель данной работы – ознакомление отечественных специалистов с новым опасным вирусами, неизвестными в России.

Abstract

Everybody have heard about the Ebola virus that causes an extremely severe hemorrhagic fever with a case fatality rate up to 90 percent. But Hendra and Nipah names, causing respiratory and neurological syndromes with the same high mortality rate, are familiar to few. The aim of this paper is to familiarize Russian specialists with new dangerous viruses unknown in Russia.

Этим летом я прошла курс инфекционных болезней в университете Кембриджа, Англия. И там я узнала, что ученые из Кебриджа очень обеспокоены смертельным потенциалом вирусов Хендра и Нипах. Огромное число наших соотечественников отдыхает на курортах Юго-Восточной Азии и Африки. Однако в России информация об этих заболеваниях даже среди специалистов ещё не распространилась. Лекцию

нам читал профессор Джеймс Вуд (James Wood), заведующий кафедрой ветеринарной медицины, Кембридж, Англия. Он сказал, что в их стране, хотя она и территориально дальше от Азии, есть тест-системы и ПЦР наборы, позволяющие быстро определить эти вирусы. Если турист приехал из региона, где были зафиксированы вспышки заболевания, и имеет ярко выраженные клинические признаки с респираторной симптоматикой, то медицинские службы готовы и обязаны проверить его на наличие данных вирусов. По приезду в Россию я обзвонила инфекционные государственные больницы Москвы и проверила сайты платных медицинских учреждений – нигде нет возможности провериться на эти вирусы. Так что же, мы просто не узнаем, от чего умер россиянин, приехавший, к примеру, из Вьетнама? Давайте разбираться, что это за опасные инфекции.

Зоонозные хенипавирусы привели к гибели людей в Австралии, Малайзии, Сингапуре, Индии и Бангладеш. Видовой состав рукокрылых, причастных к циркуляции вируса, представлен семью видами плодядных и одним видом насекомоядных летучих мышей. Эти зверьки распространены по всей индо-тихоокеанской области.

ВИРУС ХЕНДРА

В 1994 году произошла вспышка острого респираторного заболевания с высоким уровнем смертности у породистых лошадей в частной конюшне района Хендра города Брисбен на востоке Австралии. В результате у двух сотрудников, которые ухаживали за животными, развилась тяжелая гриппоподобная болезнь и через несколько дней один из них погиб. Новый вирус был изолирован от больной лошади и больного человека, и клиническая картина была экспериментально воспроизведена на лошадях в условиях лаборатории. С того времени и по сегодняшний день спорадически продолжают случаться случаи этой страшной болезни и у лошадей и у людей. Чаще всего инфицируются сотрудники сельского хозяйства, ветеринары, которые работают в тесном контакте с животными или проводят вскрытие уже павших лошадей. Генно-молекулярный анализ вирусов, выделенных от лошадей, людей и летучих мышей свидетельствовал о наличии тесной взаимосвязи между собой и с вирусами рода Морбилливирус. Из-за этого первоначальное обозначение этого вируса упоминается как лошадиный (эквин) морбилливирус. Чтобы избежать путаницы с возможными будущими изолятами и не делать привязку к лошадям, обозначение вируса было изменено на Хендра, чтобы отразить расположение первой изоляции. В последст-

вии, новый вирус вместе с вирусом Нипах сформировал род *Henipavirus* семейства *Paramyxoviridae* порядка *Mononegavirales*. Вирусы нового рода – сферической формы, их диаметр 120–150 нм. Геном представлен одноцепочечной несегментированной РНК, имеются капсид и суперкапсид. Встроенные гликопротеины прикрепления (G) и расщепления (F), а также фосфопротеиназа (P) обеспечивают проникновение РНК вируса в чувствительную клетку-мишень.

Клинические особенности и эпидемиология

Вирус Хендра циркулирует как субклиническая инфекция, то есть без видимых клинических признаков, у определенных видов плодоядных и насекомоядных летучих мышей. Передача вируса лошадям и людям происходит через загрязнение окружающей среды, а особенно фруктов, любыми выделениями крыланов (слюна, фекалии, моча, плацентарная жидкость). Клинические признаки у зараженных лошадей включают анорексию, депрессию, лихорадку, и увеличение частоты дыхания и сердцебиения, сопровождаются респираторными или неврологическими симптомами [1]. Фаза клинических признаков, как правило, имеет острое течение и животные быстро умирают. Инкубационный период у экспериментально зараженных лошадей был от 6 до 10 дней. Кошки, хорьки, хомяки, морские свинки очень восприимчивы к экспериментальному заражению, и характер клинической картины идентичен, что и у лошадей. Кролики и мыши оказались не восприимчивы к экспериментальному заражению [2].

Диагноз

Эпидемиологию, клинические признаки вирусной инфекции Хендра у лошадей легко спутать с африканской чумой лошадей. Однако при последней упомянутой инфекции часто происходит сильный отек подкожной клетчатки головы и шеи. Экспресс-диагностика может быть проведена с помощью ПЦР реального времени, и вирус может быть выявлен в тканях посредством иммунофлюоресценции или иммуногистохимического окрашивания. Культивирование вируса возможно в различных типах культур клеток тканей, но «Vero» являются предпочтительными. Также диагноз можно подтвердить по реакции нейтрализации и ИФА. Последний является наиболее предпочтительным из-за вопросов безопасности, касающихся требований к использованию живых вирусов в реакции нейтрализации. Образцы должны быть доставлены в таре высокой герметичности, и любые работы должны осущест-

вляться в лабораториях уровня биобезопасности 4 (по ВОЗ) или в лабораториях, проводящих работы с патогенными биологическими агентами 1-2 группы (по классификации РФ).

ВИРУС НИПАХ

В 1998–1999 годах была зарегистрирована вспышка острого энцефалита с высокой смертностью среди рабочих свиноводческих хозяйств Малайзии. Одновременно заболевание регистрировалось и у свиней с респираторной симптоматикой, носовым кровотечением, одышкой и кашлем у поросят. Более старые животные проявляли неврологические признаки, такие как атаксия, парез, судороги и мышечный тремор. Уровень смертности у людей был примерно 50 %, у свиней – более низкий. Развитие энцефалита у людей и животных привело к предположению, что в качестве возбудителя выступает вирус японского энцефалита. Однако последующая вакцинация людей против данной инфекции оказалась провальной. В последующем от больных людей и павших свиней был изолирован морбилливирус. По нескольким антигенам он был связан с вирусом Хендра, но последующий генетический анализ последовательностей выявил новый вид в роду *Nipavirius*, и в настоящее время он обозначается как вирус Нипах. Название это произошло от наименования села в Малайзии, где вирус нанёс огромный урон животноводству и среди аборигенов значился, как «синдромом лающей свиньи» из-за характерного кашля. По результатам геномного секвенирования вируса Нипах от свиней, людей и крыланов подтверждена их высокая идентичность, гомология составляет 99 %. Пути заражения: алиментарный (от обсемененных слюной фруктов, пальмового сока и др.), воздушно-капельный, контактный (например, при разделке туш павших животных). Вирус может быть изолирован с носоглоточных смывов инфицированных свиней, начиная уже с четвертого дня после заражения. Помимо свиней экспериментально было доказано, что кошки и морские свинки также могут быть инфицированы вирусом Нипах и могут представлять угрозу для человека как новый вектор передачи [2].

Иммунитет, лечение и профилактика

У лошадей, которые выжили после Хендра инфекции, а у свиней после Нипах развиваются нейтрализующие антитела в очень высоком титре [2]. В настоящее время нет вакцин или эффективных противовирусных препаратов, лицензированных для лечения человека. Во время первой вспышки Нипах в Малайзии был в терапевтических целях использован

рибавирин, но видимых результатов он не проявил. Также рибавирин был применён в Австралии для лечения пациентов, инфицированных Хендра, и опять же отсутствовал хороший терапевтический эффект. В 2009 году для лечения пациента с Хендра инфекцией решили попробовать схему хлорохина с рибавирином, однако клинического эффекта не наблюдалось, человек погиб [3]. В 2015 году в Австралии компания Пфайзер выпустила вакцину для профилактики Хендра инфекции у лошадей [4]. Антигенным детерминантом в ней служит гликопротеин G. Жеребят вакцинируют в возрасте 4 и 6 месяцев с последующей ревакцинацией каждый год. Однако, данный препарат пока прошел лицензирование только на территории Австралии. За рубеж не продается. В обязательный календарь прививок не входит. Приобретается частными коневодами за их счет, то есть финансирование государственными органами не происходит даже во время энзоотий. В настоящее время разных странах мира, преимущественно в Австралии, Англии и США, ведутся разработки вакцины для людей против Нипах и Хендра. Неспецифическая профилактика направлена на снижение риска заболеваемости путем повышения информированности населения эндемичного региона о необходимости избегать контактов с рукокрылыми, не употреблять необработанный пальмовый сок и немытые фрукты, возможно загрязненные выделениями крыланов.

Литература

1. Куликов Е.В., Ватников Ю.А., Сачивкина Н.П. Частная патологическая анатомия. М.: РУДН. 2013. 76 с.
2. Dhondt KP, Horvat B. Henipavirus infections: lessons from animal models. *Pathogens*. 2013;2(2):264–87.
3. Mathieu C, Horvat B. Henipavirus pathogenesis and antiviral approaches. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(3):343–54.
4. State of Queensland, Australia. Department of Agriculture and Fisheries [DAF]. Veterinarian guidelines and assistance for handling Hendra virus in horses. Queensland DAF; 2015 Nov. Available at: <https://www.business.qld.gov.au/industry/service-industries/veterinary-surgeons/guidelines-hendra>. Accessed 28 Dec 2015.

**ВИРУСЫ ГРИППА А И В, ЦИРКУЛИРОВАВШИЕ
СРЕДИ ЛЮДЕЙ В РОССИИ
В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2016–2017**

INFLUENZA VIRUSES A AND B, CIRCULATED AMONG PEOPLE
IN RUSSIA DURING 2016–2017 FLU SEASON

С.В. Святченко, А.Г. Дурьманов, Н.И. Гончарова,
Н.П. Колосова, И.М. Суслопаров, А.В. Епанчинцева, А.С. Гудымо,
В.Ю. Марченко, В.Н. Михеев, А.Б. Рыжиков, Т.Н. Ильичева

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

S.V. Sviatchenko, A.G. Durymanov, N.I. Goncharova,
N.P. Kolosova, I.M. Susloparov, A.V. Epanchintseva, A.S. Gudymo,
V.Yu. Marchenko, V.N. Mikheev, A.B. Ryzhikov, T.N. Ilicheva

SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Мониторинг за распространением сезонных вирусов гриппа в эпидемическом сезоне 2016–2017 в России выявил преобладание штаммов А(Н3N2) и В(Victoria). Серологический и филогенетический анализ показали схожесть циркулировавших штаммов с вакцинными. Все выделенные изоляты были чувствительны к ингибиторам нейраминидазы.

Abstract

During 2016–2017 flu season the most prevalent were strains of Influenza virus A(H3N2) and Influenza virus B (Victoria). Isolated strains were antigenically and genetically similar to the strains, included in vaccine. All tested isolates were susceptible to neuraminidase inhibitors.

В эпидемическом сезоне 2016–2017 в рамках проведения мониторинга за тяжелыми случаями течения респираторных инфекций нами был получен биологический материал от пациентов с лабораторно установленным диагнозом грипп из 29 регионов Российской Федерации. Мы проанализировали пробы от 506 случаев заболевания, 49 из кото-

рых завершились летальным исходом. После подтверждения наличия в образцах РНК возбудителя гриппа А или В методом ОТ-ПЦР, из них проводили выделение вируса в культуре клеток MDCK. Таким образом, из 457 носоглоточных мазков нами было выделено 76 изолятов вируса гриппа А(Н3N2), 14 изолятов вируса гриппа В генетической линии Victoria и 1 изолят вируса гриппа А(Н1N1pdm09). Из секционного материала был выделен 1 изолят вируса гриппа А(Н1N1pdm09) и 2 изолята вируса гриппа В(Victoria). Из 42 образцов секционного материала, положительных на грипп А(Н3N2) по результатам ОТ-ПЦР, полученным в региональных центрах гигиены и эпидемиологии, лишь 28 оказались положительными при проведении подтверждающего анализа. Из аутопсийного материала не удалось выделить ни одного изолята вируса гриппа А(Н3N2).

Оба выделенных изолята вируса гриппа А(Н1N1pdm09) были антигенно схожи как со штаммом A/California/07/2009, входившим в вакцину в сезоне 2016–2017, так и с заменившим его в составе вакцины 2017–2018 штаммом A/Michigan/45/2015. Также как и штамм A/Michigan/45/2015, выделенные изоляты были отнесены к генетической группе 6В.1.

Все выделенные нами изоляты вируса гриппа В относились к генетической линии Victoria. 7 штаммов, для которых было проведено полногеномное секвенирование, были отнесены к кладе 1А, в которую входит и вакцинный штамм B/Brisbane/60/2008. Тем не менее, титры хорьковой референс-сыворотки anti-B/Brisbane/60/2008 в РТГА с полученными штаммами отличались в 4–8 раз от титра с гомологичным штаммом, что, вероятно, явилось следствием не столько антигенного отличия циркулирующих штаммов от вакцинного, сколько особенностями получения самой сыворотки (она была получена на вирус, наработанный не на культуре клеток, а на развивающихся куриных эмбрионах, что, вероятно, привело к небольшим изменениям антигенных свойств). Среди отсекутированных изолятов не было выявлено штаммов, характеризующихся делецией в положении 162–163 в первой субъединице гемагглютинаина, которые спорадически выявлялись в Европе в минувшем сезоне.

Антигенная характеристика преобладавших в первой половине сезона вирусов гриппа А(Н3N2) была затруднена тем, что выделенные изоляты на первом пассаже не давали гемагглютинации с эритроцитами гуся, петуха и морской свинки. Повторное пассирование в культуре клеток позволяло добиться гемагглютинации с эритроцитами морской свинки ко второму, а в некоторых случаях и к третьему пассажу. Тестирование изолятов, наработанных подобным образом, в РТГА с хорьковыми референсными сыворотками показало, что штаммы, циркулировавшие в сезоне 2016–2017 не

реагировали с сывороткой anti-A/Switzerland/9715293/13, однако взаимодействовали с сывороткой, полученной против штамма, входящего в ту же генетическую подгруппу (3С.2а), что и вакцинный штамм A/Hong Kong/4801/14. Для 21 изолята A(H3N2) – подтипа было проведено полно-геномное секвенирование. По результатам филогенетического анализа все они были отнесены к субкладе 3С.2а.

В флуоресцентном тесте ингибирования нейраминидазы было показано, что все выделенные штаммы оказались чувствительны к действию анти-нейраминидазных препаратов осельтамивира и занамивира, что свидетельствует о целесообразности их применения в терапии гриппа.

Таким образом, в первой половине эпидемического сезона 2016–2017 наибольшее распространение получили штаммы вируса гриппа A(H3N2). Начиная с 8 недели преобладающими в циркуляции стали штаммы вируса гриппа В генетической линии Виктория. Эпидемический сезон 2016–2017 гг. длился больше предыдущего, однако подъем заболеваемости был менее резким, и было зарегистрировано значительно меньшее количество случаев смерти от гриппа. В силу изменения в составе вакцины H1N1pdm09-компонента, в целях профилактики тяжелого течения заболевания в следующем сезоне важной является иммунизация вакциной обновленного состава.

ШИРОКИЙ СПЕКТР ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ БИЦИКЛИЧЕСКИХ ТЕРПЕНОИДОВ *

WIDE SPECTRUM OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF BICYCLE TERPENOID DERIVATIVES

А.С. Соколова ¹, О.И. Яровая ^{1,2}, А.А. Кононова ²,
В.В. Зарубаев ³, Н.Ф. Салахутдинов ^{1,2}

¹ Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова

² Новосибирский государственный университет

³ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

A.S. Sokolova, ¹ O.I. Yarovaya ^{1,2}, A.A. Kononova ²,
V.V. Zarubaev ³, N.F. Salakhutdinov ^{1,2}

¹ NIOCH SB RAS, Russia

² NSU, Russia

³ Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology

e-mail: asokolova@nioch.nsc.ru

Аннотация

В данной работе изучена противовирусная активность широкого ряда производных бициклических терпеноидов в отношении вируса гриппа. Выявлено соединение-лидер. Предполагено, что вероятный механизм действия заключается в ингибировании вирусного белка гемагглютинаина.

Abstract

The antiviral activity of a wide range of bicyclic terpenoid derivatives against the influenza virus has been studied. The leader compound was identified. It is suggested that the likely mechanism of action is the inhibition of the viral protein hemagglutinin.

* Данная работа выполнена в рамках проекта, поддержанного Российским научным фондом (N 15-13-00017).

Предметом исследования настоящей работы являются химические модификации монотерпеноидов, содержащих в своем осто́ве бицикло-[2.2.1]-каркасный фрагмент – (+)-камфора и (-)-борнеол с целью выявления соединений, обладающих выраженной противовирусной активностью. Было показано, что симметричные соединения, имеющие в своём осто́ве фрагменты камфоры, две иминогруппы и (или) четвертичные заряженные атомы азота проявляют высокую противовирусную активность.[1]. При этом было обнаружено, что увеличение длины цепочки между четвертичными атомами азота приводит к увеличению токсичности, восстановление иминогруппы в симм-дииминах на основе камфоры также значительно увеличивает токсичность исследуемых соединений [2] (рис. 1).

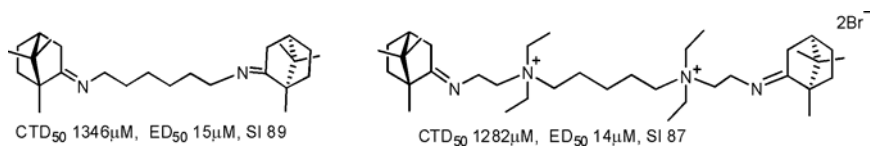


Рис. 1

Были получены ими́ны на основе (+)-камфоры содержащие бициклический природный фрагмент, ими́но и спиртовую группу **7-9**, простые и сложные эфиры ими́носпиртов **10-13**. Получены соединения, содержащие ими́нную и дополнительную азотную группу – первичные и третичные амины **14-17** и др [3, 4]. Исследования биологической активности синтезированных соединений **2-36**, в отношении вируса гриппа (штамм A/California/07/09 (H1N1)pdm09), показали их высокую эффективность как ингибиторов репродукции этого вируса. Нами было выбрано соединение-лидер, основываясь на следующих критериях: высокая противовирусная активность, низкая токсичность и достаточно хорошая растворимость. По совокупности данных критериев таким соединением оказалось ими́нопроизводное **7**, полученное на основе (+)-камфоры и аминокэтанола.

В работе [5] представлены данные по изучению спектра активности соединения **7** на вирусах гриппа различного происхождения и серотипа. Проведены эксперименты по изучению противовирусной активности в зависимости от времени добавления к инфицированным клеткам. Показано, что наиболее выраженные вирусингибирующие свойства проявляет в период 0-2 часа после инфицирования. Предположено, что вероятный механизм действия заключается в ингибировании вирусного белка гемагглютинина, который обеспечивает способность вируса присоединяться к клетке-хозяина.

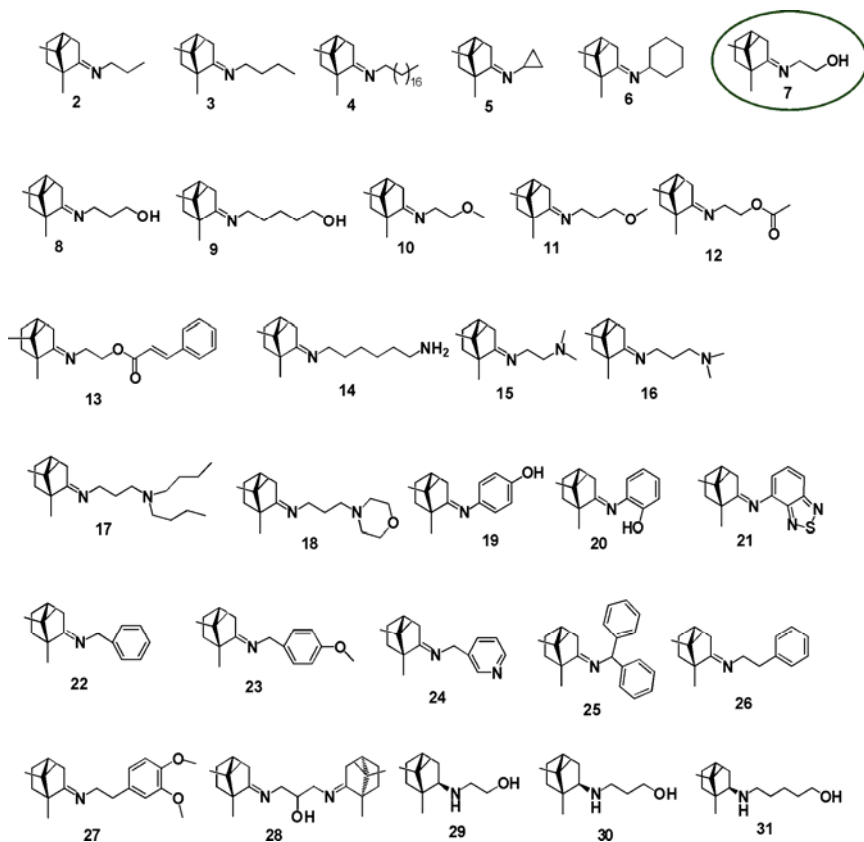
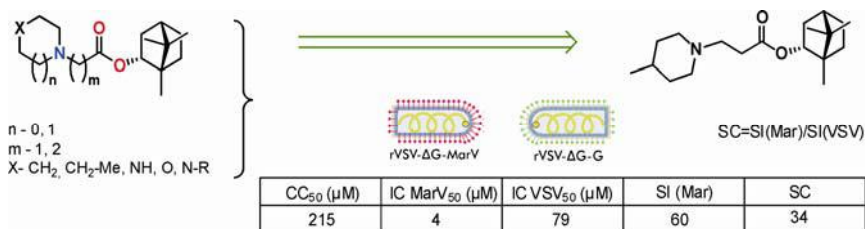


Рис. 2

Развивая наши исследования, в качестве исходного скелета для синтеза библиотек целевых соединений был выбран природный спирт борнеол, обладающий нативной биологической активностью. Гетероциклические производные (-)-борнеола показали выраженную ингибирующую активность в отношении вируса гриппа [6].

Расширяя спектр изучаемой активности, была изучена активность соединений, представляющих собой N-содержащие производные сложных эфиров борнеола, в отношении входа вируса Марбург в клетку с применением псевдовиральной системы на основе капсида вируса везикулярного стоматита. Среди низкотоксичных производных борнеола обнаруживаются шесть веществ, являющихся относительно специфическими ингибиторами Marb-GP – опосредованной инфекции ($SC > 10$).



Таким образом, нами было показано, что бициклические монотерпены, содержащие каркасный структурный фрагмент являются перспективным источником агентов, обладающих широким спектром противовирусной активности.

Литература

1. Sokolova, A.S. et al // Bioorg. Med. Chem. 2013. Vol. 21. P. 6690–6698.
2. Sokolova, A.S. et al // Bioorg. Med. Chem. 2014. Vol. 22. P. 2141–2148.
3. Sokolova A.S. et al // Eur. J. Med. Chem. 2015. Vol. 105. P. 263–273.
4. Sokolova A.S. et al // Eur. J. Med. Chem. 2017. Vol. 127. 661–670
5. Zarubaev V.V. et al // Antiviral Research. 2015. Vol. 120. P. 126–133.
6. Sokolova A.S. et al // MedChemComm. 2017. N. 8. P. 960–963.

АНАЛИЗ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО СЕКРЕТИРУЕМЫЙ ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК ГМ-КСФ/ЛАКТАПТИН

ANALYSIS OF ONCOLYTIC PROPERTIES OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS STRAIN, WHICH PRODUCES A SECRETED CHIMERIC GM-CSF/LACTAPTIN PROTEIN

А.В. Ткачёва^{1,2}, Г.В. Кочнева¹, Г.Ф. Сиволобова¹,
О.А. Коваль², Е.В. Кулигина², В.А. Рихтер²

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

A.V. Tkacheva^{1,2}, G.V. Kochneva¹, G.F. Sivolobova¹,
O.A. Koval², E.V. Kuligina², V.A. Richter²

¹ State Research center of Virology and Biotechnology "Vector"

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine

Аннотация

На основе штамма Л-ИВП вируса осповакцины (VACV) сконструирован рекомбинантный штамм VV-GMCSF/lact-dGF, содержащий делеции фрагментов генов вирусной тимидинкиназы и ростового фактора. В район делеции гена тимидинкиназы встроены трансен химерного белка GMCSF/lact, в состав которого входит генный адъювант ГМ-КСФ, соединенный через гибкий линкер GlyGlyGlySer с онкотоксическим пептидом лактаптин. Штамм VV-GMCSF/lact-dGF продемонстрировал высокую адресную онколитическую активность в отношении клеток опухолей человека различного генеза.

Abstract

Recombinant VV-GMCSF/lact-dGF was constructed using L-IVP strain of vaccinia virus (VACV). The recombinant possesses deletions of gene fragments of viral thymidine kinase and growth factor, and insertion of chimeric peptide GMCSF/lact into region of thymidine kinase gene deletion. The transgene includes gene adjuvant GM-CSF connected with oncotoxic peptide lactaptin by flexible linker GlyGlyGlySer. Strain VV-GMCSF/lact-dGF demonstrated highly targeted oncolytic activity toward human tumor cells of various origination.

Адьювантные свойства ГМ-КСФ хорошо известны и широко используются при создании различных протективных и терапевтических вакцин [1-7]. ГМ-КСФ эффективно стимулирует противоопухолевый иммунный ответ в комбинации с клеточными, вирусными и ДНК-вакцинными препаратами [7-13]. Ген ГМ-КСФ был введен в геномы наиболее успешных рекомбинантных онколитических вирусов [14-16]. Показано усиление протективных свойств белков в составе химерных конструкций с ГМ-КСФ.

В качестве онкотоксического белка нами выбран лактаптин, который является фрагментом каппа-казеина молока человека (23-134 а.о.) и специфически индуцирует гибель клеток рака молочной железы человека *in vitro* и *in vivo* [20].

В экспериментах *in vitro* штамм VV-GMCSF/lact-dGF продемонстрировал высокую адресную онколитическую активность в отношении клеток опухолей человека различного генеза.

Противоопухолевую активность *in vivo* рекомбинантного штамма VV-GMCSF/lact-dGF оценивали с использованием иммунодефицитных и иммунокомпетентных лабораторных моделей.

При интратуморальном введении препарата в дозе 1×10^7 БОЕ/мышь в ксенотрансплантаты опухоли MDA-MB-231, привитые мышам линии SCID, наблюдали, что размер и вес опухолей мышей, леченных рекомбинантным штаммом вируса осповакцины, достоверно меньше аналогичных показателей для мышей контрольной группы, что свидетельствует о высокой онколитической активности сконструированного штамма VV-GMCSF/lact-dGF в отношении опухоли молочной железы человека.

Также оценивали противоопухолевую активность рекомбинантного штамма VV-GMCSF/lact-dGF в отношении лекарственно-устойчивой опухоли лимфосаркомы RLS. В качестве модели использовали иммунокомпетентных мышей CBA/LacSto. В результате эксперимента было показано, что рекомбинантный штамм VV-GMCSF/lact-dGF обладает высокой противоопухолевой активностью, в том числе и в отношении лекарственно устойчивых опухолей животных.

Основываясь на полученных данных, представляется целесообразным дальнейшее изучение механизмов противоопухолевой активности штамма VV-GMCSF/lact-dGF и создание на его основе препарата, предназначенного для терапии злокачественных заболеваний.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА КОНТАГИОЗНОЙ ЭКТИМЫ, ВЫДЕЛЕННОГО В 2015 ГОДУ В РЕСПУБЛИКЕ ТЫВА

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ORF VIRUS, ISOLATED IN THE REPUBLIC OF TUVA IN 2015

Д.В. Янжиева, И.А. Титов, Н.И. Сальников

*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии», Россия*

D. Yanzhieva, I.A. Titov, N. Salnikov

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Russia

e-mail: darimayanzhieva2016@gmail.com

Аннотация

В статье представлен филогенетический анализ вируса контагиозной эктимы, выделенного от овец в Республике Тыва в 2015 году. Филогенетический анализ проведен на основе нуклеотидных последовательностей генов ORF011, ORF109 и ORF110.

Abstract

In the given article the phylogenetic analysis of ORF virus, isolated from sheep in the Republic of Tuva in 2015. Phylogenetic analysis is based on nucleotide sequences of ORF011, ORF109 and ORF110 genes.

Контагиозная эктима овец – инфекционная болезнь овец и коз, характеризующаяся поражением слизистых оболочек ротовой полости, кожи губ, головы, молочных желез и конечностей, сопровождающаяся образованием узелков, везикул, пустул и корок с преимущественным поражением одного какого-либо участка тела. [2].

Возбудителем заболевания является вирус контагиозной эктимы (англ. *Contagious ecthyma virus*, *ORF virus*) – представитель рода *Parapoxvirus* в подсемействе *Chordopoxvirinae* семейства *Poxviridae*. В настоящее время определены полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов

вируса контагиозной эктимы, выделенных в Америке Германии, Новой Зеландии, Китае [10]. На основе анализа этих данных установлена генетическая изменчивость вируса контагиозной эктимы, циркулирующего в разных географических районах [4, 11, 16]. Кроме того, течение последних лет наблюдают тенденцию увеличения степени распространения контагиозной эктимой среди овец и коз, а также поражения болезнью новых видов животных, что свидетельствует о разнообразии взаимодействия патогена с хозяином [14]. В связи с этим актуальными являются исследования молекулярно-генетических характеристик новых изолятов вируса контагиозной эктимы.

Целью данной работы являлся филогенетический анализ вируса контагиозной эктимы, выделенного от овец в Республике Тыва в 2015 году.

В работе использовали штамм «Эрзинский» вируса контагиозной эктимы, депонированный в Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ [1].

С целью подтверждения таксономического положения штамма «Эрзинский» провели секвенирование гена фосфолипазы (ORF 011). Полученную полноразмерную последовательность гена ORF 011 (1300 пар оснований) депонировали в GenBank под номером KY652170. Выравнивание полученной последовательности с последовательностями гена B2L штаммов и изолятов вируса контагиозной эктимы, доступных в базе данных GenBank, показало, что штамм «Эрзинский» имеет 99,91 % идентичности со штаммами Kodaikanal-1 (KU597728) и Kodaikanal-2 (KU597729) вируса контагиозной эктимы.

Для проведения филогенетического анализа определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов оболочечных гликопротеинов ORF 109 (615 пар оснований) и ORF 110 (628 пар оснований). Данные последовательности депонированы в GenBank под номерами MF974612 и MF974613.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов ORF 109 и 110 показал, что штамм «Эрзинский» входит в кластер штаммов, выделенных в Китае (рис. 1, 2). Данный кластер включает 2 геногруппы: в первую входят штаммы, выделенные в Китае от коз, во вторую – штаммы, не имеющие строго определенного географического единства в происхождении. Так, процент нуклеотидной идентичности между последовательностями генов ORF 109 и 110 штамма «Эрзинский» и штаммом Ch97, выделенным в Китае, составляет 97,7 % и 92,7 %, соответственно. Кроме того, установлено, что штамм «Эрзинский» филогенетически близок со штаммом NZ2, выделенный в Новой Зеландии (96 и 97 % нуклеотидной идентичности, соответственно) и входящим в этот же кластер.

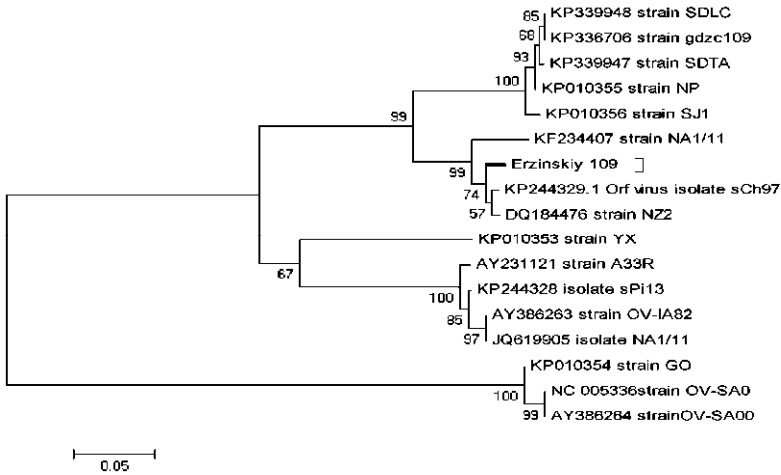


Рис. 1. Филогендограмма изолятов вируса контагиозной эктимы, построенная на основе анализа последовательностей гена ORF 109

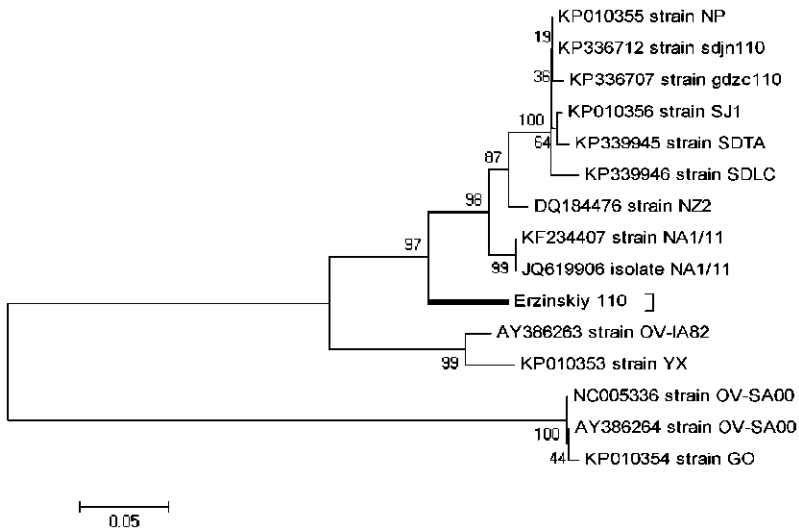


Рис. 2. Филогендограмма изолятов вируса контагиозной эктимы, построенная на основе анализа последовательностей гена ORF 110

Таким образом, дана молекулярно-генетическая характеристика штамма «Эрзинский» вируса контагиозной эктимы. Секвенированием гена фосфолипазы (ORF011) подтверждено таксономическое положение возбудителя как вируса контагиозной эктимы. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей генов оболочечных гликопротеинов (ORF 109 и ORF110) показал высокий уровень родства штамма «Эрзинский» со штаммами, выделенными в Китае.

Литература

1. Идентификация и выделение вируса контагиозной эктимы от овец в Республике Тыва в 2015 году / Д.В. Янжиева [и др.] // Сельскохозяйственная биология. № 6. 2016. С. 861–866.
2. Контагиозный пустулезный дерматит овец и коз, обзор. Ветеринарная патология / А.А. Коломыцев [и др.] // Ветеринарная патология. 2008. № 4. С. 31–37.
3. Characterization of a North American ORF virus isolated from a goat with persistent, proliferative dermatitis / J. Guo [et al.] // Virus Res. 2003. Vol. 93. P. 169–179.
4. Contagious pustular dermatitis (orf disease) – epidemiology, diagnosis, control and publichealth concerns/ R. Kumar [et al.] // Vet. Sci. 2015. Vol. 12. P. 649–678.
5. Genomes of the parapoxviruses ORF virus and bovine papular stomatitis virus / G. Delhon [et al.] // J. Virol. 2004. Vol. 78. P. 168–177.
6. Identification and phylogenetic analysis of orf virus from goats in Taiwan / K.W. Chan [et al.] // Virus Genes. 2007. Vol. 35. P. 705–712.
7. Phylogenetic Correlation of Greek and Italian Orf Virus Isolates Based on VIR Gene C. Kottaridi [et al.] // Vet. Microbiol. 2006. Vol. 116(4). P. 310–317.
8. Phylogenetic analysis of three orf virus strains isolated from different districts in Shandong Province, East China / K. Zhang [et al.] // J. Vet. Med Sci. 2015. Vol. 22. P. 687–690.

Раздел 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ
ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ПЕРИОДЕ КУЛЬТИВАЦИИ КЛЕТОК *****RESEARCH FOR PROMOTERS ACTIVITY
DURING PROLONGED CELL CULTIVATION**Д.В. Антонова¹, В.В. Плешкан^{1,2}¹ *ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук*² *ФГБУН Институт молекулярной генетики Российской академии наук*D.V. Antonova¹, V.V. Pleshkan^{1,2}¹ *IBCh RAS, Russia*² *IMG RAS, Russia*

e-mail: DinaVAntonova@gmail.com

Аннотация

Генно-терапевтические подходы, нацеленные на лечение опухолевых заболеваний, могут требовать длительного периода экспрессии терапевтического трансгена. В этих случаях регуляторные элементы, обеспечивающие экспрессию трансгена, должны обладать устойчивостью к сайленсингу при длительном периоде жизни клеток. Мы провели сравнение изменений активности промоторов CMV, PCNA и IGFBP2, контролирующих экспрессию суицидного гена HSVtk при длительной культивации клеток.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-04-01842.

Abstract

Gene therapy approaches aimed at treating tumor diseases may require a long period of expression of the therapeutic transgene. In these cases, the regulatory elements that ensure transgene expression must be resistant to silencing in the long term of cell life. We compared the changes in the activity of the CMV, PCNA and IGFBP2 promoters controlling the expression of the HSVtk suicide gene during prolonged cell cultivation.

Для рака поджелудочной железы (РПЖ) характерна крайняя степень агрессивности и защищенность раковых клеток развитым микроокружением опухоли, которое обуславливает резистентность раковых клеток к большинству противоопухолевых препаратов. Это заболевание характеризуется поздней диагностикой, при котором радикальное хирургическое лечение уже невозможно.

Генная терапия рака, основанная на образовании внутри клеток опухоли либо её микроокружения продуктов терапевтических трансгенов, является одной из стратегий, позволяющей достичь элиминации опухоли. Такой подход требует модификации опухоли либо её микроокружения для конститутивной экспрессии трансгена в течение длительного времени. Однако этот подход должен учитывать возможную инактивацию трансгена путем сайленсинга промотора.

Ранее было отобрано несколько промоторов для использования в качестве контролирующего экспрессию элемента при исследованиях функционального статуса трансгена, культивируемого в течение длительного времени. Так были использованы – ранний промотор цитомегаловируса CMV в качестве контрольного конститутивного промотора, который наиболее часто подвергается сайленсингу; промотор гена IGFBP2, для которого ранее была показана предпочтительная экспрессия в клетках микроокружения при РПЖ и эффективность репортерных конструкций на его основе в линиях РПЖ; промотор гена PCNA, который может являться достаточно сильным и универсальным промотором для клеток человека. Наиболее предпочтительным будет такой промотор, который обеспечит высокую эффективность, и стабильность экспрессии трансгена при культивации клеток в течение длительного времени.

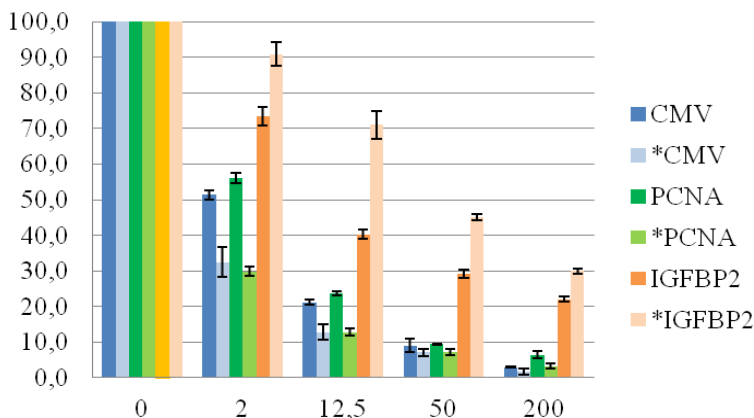
Были созданы генетические конструкции на основе самоинактивирующихся лентивирусных векторов, в которых один из трех выбранных промоторов контролировал экспрессию суицидного гена – тимидинкиназы вируса простого герпеса типа 1 (HSVtk), продукт которого способен конвертировать нетоксичное для клеток человека соединение ганцикловир в его токсичное производное. Данные конструкции были использованы для трансфекции клеток линии НЕК293-Т, в результате чего были получены

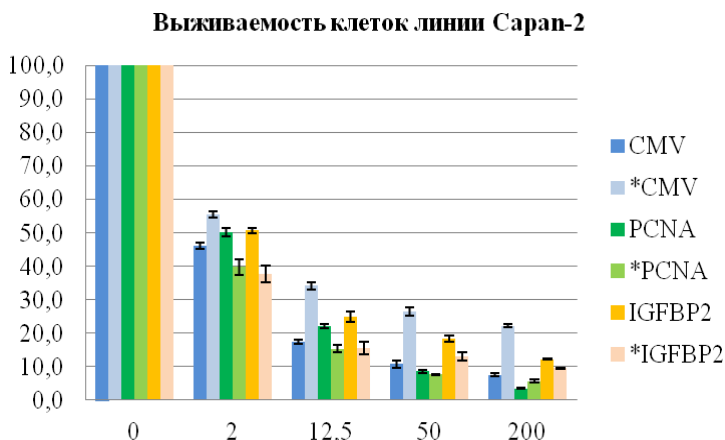
лентивирусные частицы, которые использовали для трансдукции клеточных линий рака поджелудочной железы – Сарап-2 и MIA PaCa-2. После проведения пуромициновой селекции, были получены стабильно трансфицированные клеточные линии, в которые были интегрированы фрагменты ДНК, несущие суицидный ген HSVtk под контролем одного из трех промоторов – CMV, IGFBP2 или PCNA.

Стабильно трансфицированные клеточные линии были использованы для проведения цитотоксического теста, для этого отбирали часть клеток и добавляли к ним ганцикловир в концентрациях 0; 2; 12,5; 50 и 200 мкМ. Другая часть клеток была культивирована в течение месяца, после чего проводили аналогичный MTS-тест. Тимидинкиназа вируса простого герпеса конвертирует добавляемый ганцикловир в ганцикловир-фосфат, который конвертируется клеточными ферментами до трифосфата и способен встраиваться в растущую цепь ДНК при делении клетки, однако его встраивание делает невозможным дальнейшую репликацию ДНК и вызывает гибель клетки, преимущественно путем вхождения в апоптоз. Степень конверсии ганцикловира в монофосфат в основном определяется количеством фермента, присутствующего в клетке. В полученных модифицированных клетках данный фермент нарабатывался с конструкций, отличающихся только промотором, обеспечивающим транскрипцию гена HSVtk. Таким образом, мы могли косвенно оценить эффективность работы каждого исследуемого промотора по цитотоксическому эффекту, вызванному добавлением ганцикловира.

В результате проведенного цитотоксического теста были получены следующие данные:

Выживаемость клеток линии MIA PaCa-2





На графиках указано: по оси ординат – выживаемость клеток в %; по оси абсцисс – концентрация ганцикловира; названия промоторов контролирующих экспрессию гена HSVtk обозначены справа, с указанием соответствующего цвета используемого на графике. Промоторы, обозначенные значком * – данные после месяца культивации.

Было показано, что в линии MIA PaCa-2 эффективность введенных в геном конструкций с промоторами CMV и PCNA почти не отличается и увеличивается со временем. Эффективность конструкции с IGFBP2 промотором наоборот – достаточно низка и уменьшается со временем, что вероятно говорит о сайленсинге промотора IGFBP2 в линии MIA PaCa-2. Для линии Саран-2 показано, что наиболее эффективна конструкция с CMV промотором, которая, однако, со временем предположительно инактивируется. Эффективность конструкций с промоторами PCNA и IGFBP2 в начале эксперимента сравнима с CMV, и далее не уменьшается при длительной культивации. В контрольных экспериментах с нетрансформированными клеточными линиями гибели клеток при разных концентрациях ганцикловира не наблюдали.

Наиболее интересным представляется то, что промотор PCNA способен обеспечивать эффект действия суицидного гена, сравнимый с конструкцией использующей промотор CMV, который обычно на порядок эффективнее (при сравнении с использованием репортерных генов). Разумеется, при оценке эффекта путем проведения MTS-теста, мы видим косвенную активность промотора, которая складывается как из транскрипционной активности, так и байстендер эффекта токсических метаболитов, и других факторов, однако, с точки зрения дальнейшего терапевтического применения важен именно суммарный эффект, который сможет быть обеспечен.

РАЗРАБОТКА ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕЛАНОМЫ *

DESIGN OF RECOMBINANT ONCOLITYC VACCINIA VIRUS FOR THE TREATMENT OF MELANOMA

Т.В. Бауэр, Т.В. Трегубчак, А.З. Максютов,
Е.В. Гаврилова, Р.А. Максютов

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

T.V. Bauer, T.V. Tregubchak, A.Z. Maksyutov,
E.V. Gavrilova, R.A. Maksyutov

SRC VB «Vector», Russia

e-mail: bauehr-tatjana@rambler.ru

Аннотация

Меланома – злокачественная опухоль, образующаяся при перерождении клеток меланоцитов, которые в нормальном состоянии находятся преимущественно в коже и вырабатывают под действием ультрафиолетового излучения пигмент меланин. В настоящее время заболеваемость таким видом рака возрастает: ежегодно регистрируют от 2 до 3 миллионов раковых заболеваний кожи.

Мы предлагаем новый подход в лечении данного онкологического заболевания путем совместного использования методов иммунной терапии и онколитической виротерапии.

Таким образом, онколитический иммуностимулирующий агент на основе вируса осповакцины, обеспечит надежный литический эффект и повышенную презентацию антигенов, характерных для клеток меланомы, в сочетании с мощной иммунной стимуляцией Т-клеточного ответа против клеток меланомы.

Abstract

Melanoma is a malignant tumor that is formed during the regeneration of melanocyte cells, which in the normal state are mainly in the skin and produce the

* Работа поддержана грантом РНФ (грант № 16-15-10101).

pigment melanin under the action of ultraviolet radiation. Currently, the incidence of this type of cancer increases: annually register from 2 to 3 million skin cancers.

We offer a new approach in the treatment of this cancer by sharing the methods of immune therapy and oncotic virotherapy.

Thus, the oncolytic immunostimulatory agent based on the vaccinia virus will provide a reliable lytic effect and an enhanced presentation of the antigens characteristic of melanoma cells, combined with powerful immune stimulation of the T-cell response against melanoma cells.

Меланома – злокачественная опухоль, образующаяся при перерождении меланоцитов. Данное онкологическое заболевание редко диагностируют на I-III стадиях развития, и первые клинические признаки, как правило, обнаруживают только на стадии с метастатическим распространением [1]. Это связано с быстрой миграционной способностью клеток меланомы и их высокой способностью проникать через кровеносные и лимфатические сосуды в здоровые ткани организма.

При лечении метастазирующей меланомы применяют комплекс, состоящий из методов иммунотерапии и химиотерапии. Отдаленные метастазы редко удаляют хирургическим вмешательством, а реакция меланомы на лучевую терапию или химиотерапию незначительна [2]. Поэтому ключевым звеном в успешной терапии меланомы является иммунотерапия.

Клинические исследования свидетельствуют о корреляции регрессии меланомы и активации опухолеспецифичных CD8+ и CD4+ Т-лимфоцитов, которые обнаруживают в периферической крови и удаленных метастазах. Активация происходит за счет гиперэкспрессии опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) на поверхности злокачественных клеток, что целесообразно использовать в качестве основы для создания нового противоопухолевого препарата.

Нами был проанализирован перечень ОАА, характерных для меланомы, и согласно литературным данным были выбраны наиболее часто встречающиеся антигены на поверхности неопластических клеток меланомы. После чего биоинформатическими методами был сконструирован искусственный иммуноген, состоящий из эпитопов антигенов, гиперэкспрессирующихся при меланоме.

В качестве способа доставки в клетки целевой конструкции был выбран вирус осповакцины (ВОВ), препараты на основе которого проходят клинические испытания в США.

Ранее сотрудниками лаборатории был получен рекомбинантный ВОВ на основе штамма Л-ИВП с делециями генов, кодирующих тимидинкиназу

(TK) и вирусный фактор роста (VGF), что привело к значительному снижению уровня репликации вируса в неделящихся клетках. В район гена ТК методом временной доминантной селекции, в рамках данной работы, мы встроили ген, кодирующий гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор, который является стимулятором иммунной системы организма, и используется в поддерживающей терапии при лечении онкологических заболеваний.

После чего в состав гена, кодирующего мембранный гликопротеин A34, ввели две точечные нуклеотидные замены, приводящие к аминокислотным заменам K151E, D110N. Данный подход позволяет увеличить продукцию внеклеточных оболочечных вирионов, обладающих лучшей способностью распространения вируса по организму в целом и усиливающих онколитический эффект.

Также в район гена VGF произвели встройку полиэпитопной конструкции, направленной на стимуляцию Т-клеточного ответа против клеток меланомы.

Таким образом, целью данной работы являлось создание методами генетической инженерии рекомбинантного онколитического иммуностимулирующего вируса осповакцины, содержащего эпитопы антигенов, гиперэкспрессирующихся при меланоме.

В статьях, посвященных разработке новых противоопухолевых препаратов, все чаще фигурирует понятие «онколитическая иммунотерапия». Это многообещающий подход в лечении онкологических заболеваний, и он требует дальнейших исследований.

Литература

1. Jacob Pitcovski, EhudShahar, Elina Aizenshtein, Raphael Gorodetsky. Melanoma antigens and related immunological markers critical reviews in oncology/ Hematology-Vol. 115, July 2017, P. 36–49
2. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB/ Genome Research. 2012. 22(9). P. 1790–1797.

РАЗРАБОТКА И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К CD20

DESIGN AND COMPARATIVE ANALYSIS OF CD20-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS

Т.Н. Беловежец

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
Новосибирский государственный университет*

T N. Belovezhec

*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS
Novosibirsk State University*

e-mail: ochotanya@gmail.com

Аннотация

Клинические испытания последних лет подтвердили высокий терапевтический потенциал CAR Т-клеточной платформы для лечения резистентных форм острого лимфобластного лейкоза (r/ALL). Успех применения таких CD19-специфических CAR Т-клеток стимулировал создание и тестирование CAR, направленных против альтернативных В-клеточных маркеров, таких как CD20, CD22, BCMA и Igk, для помощи пациентам с другими неоплазиями В-клеточной природы и пациентам с CD19-негативным rALL. В частности, в настоящее время в клинических испытаниях находятся два CD20-специфических CAR на основе мышиных антител Leu16 и 1F5, значительно отличающиеся друг от друга модульным составом. Несмотря на обнадеживающие результаты, пока не проведено систематических исследований, которые бы позволяли судить об относительной эффективности имеющихся CD20-CAR, или которые были бы направлены на их структурную оптимизацию. В данной работе была создана унифицированная платформа для проведения такого сравнения. Используя эту платформу, нами впервые получен и охарактеризован CD20-CAR на основе человеческого антитела 2F2, что позволило сравнить *in vitro* активность CAR на основе Leu16, 1F5 и 2F2.

Abstract

Adoptive transfer of T-cells expressing chimeric antigen receptors (CARs) specific for the surface B cell molecule CD19 has been shown to be highly successful for treating r/ALL patients. This success has bolstered interest of several research groups to develop CARs recognizing alternative B-cell targets, such as CD20, CD22, BCMA, and Igk, in order to help patients with other B-cell malignancies or CD19-negative forms of r/ALL. Currently, there are two CD20-specific CARs in clinical trials. These CARs are based on the sequences of murine monoclonal antibodies Leu16 and 1F5 and have distinct modular composition.

Although both of these CARs appear to work, their side-by-side comparisons or structural optimization have never been performed *in vitro* or *in vivo*. The goal of our project was to design a CD20-specific CAR based on the human monoclonal antibody 2F2 and to compare this CAR to Leu16- and 1F5-based CARs in a unified context.

Во всем мире ситуация с онкогематологическими заболеваниями остается стабильно тяжелой. Такие заболевания поражают пациентов всех возрастов, и если у детей вероятность благоприятного исхода достаточно высока даже после одного рецидива, то у взрослых шансов на выздоровление гораздо меньше. С развитием адаптивной Т-клеточной терапии в области гематоонкологии произошел настоящий прорыв: от 50 до 90 % пациентов с рецидивирующими и устойчивыми формами В-клеточных неоплазий, получившие терапию экспрессирующими CAR (химерные антигенные рецепторы) Т-клетками, полностью излечиваются. На сегодняшний день не было проведено систематических исследований, которые бы позволяли судить об относительной эффективности имеющихся CD20-CAR, или которые были бы направлены на их структурную оптимизацию. Таким образом, создание унифицированной платформы для проведения такого сравнения является крайне важной задачей.

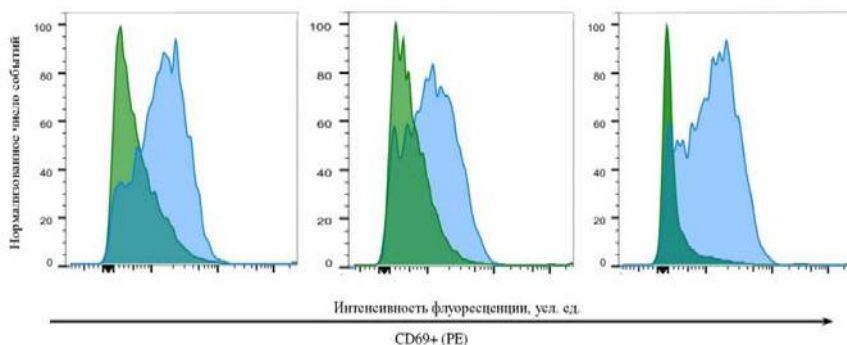


Рис. 1. Цитофлуориметрический анализ активации CAR-Jurkat клеток до (зеленый) и после (голубой) инкубации с CD20+ клетками-мишенями линии Raji.
а – 2F2(CD20) CAR-v1-Jurkat; б – Leu16(CD20) CAR-v1-Jurkat;
в – 1F5(CD20) CAR-v1-Jurkat

Нами были получены лентивирусные конструкции, кодирующие CD20-специфичные CAR первого и второго поколений, отличающиеся лишь антиген-распознающей частью, заимствованные из последовательностей мышиных антител Leu16 и 1F5, а также человеческого антитела 2F2. Такой дизайн обеспечивает возможность корректного сравнения активностей данных CAR при идентичном уровне поверхностной экспрессии и стерических параметрах им-

мунного синапса между CAR T-клетками и клетками-мишенями. Полученными на основе этих конструкций лентивирусными частицами была проведена трансдукция T-клеток линии Jurkat и NK-клеток линии YT. В присутствии CD20+ клеток-мишеней, но не CD20- клеток, происходила специфическая активация клеток CD20 CAR Jurkat (рис. 1). При этом уровень нежелательной фоновой активации CAR на основе 2F2 был значительно ниже (рис. 1, значения справа от вертикальной линии), что, по-видимому, связано с меньшей склонностью данного CAR вызывать лиганд-независимый тонический сигналинг – свойство, отрицательно сказывающееся на возможности длительного поддержания активных CAR T-клеток в организме пациента.

Затем нами была проверена цитотоксическая активность полученных CD20 CAR-YT клеток: они специфически лизировали клетки-мишени, причем уровень активности при низких соотношениях Е:Т был сопоставим для различных CAR (рис. 2).

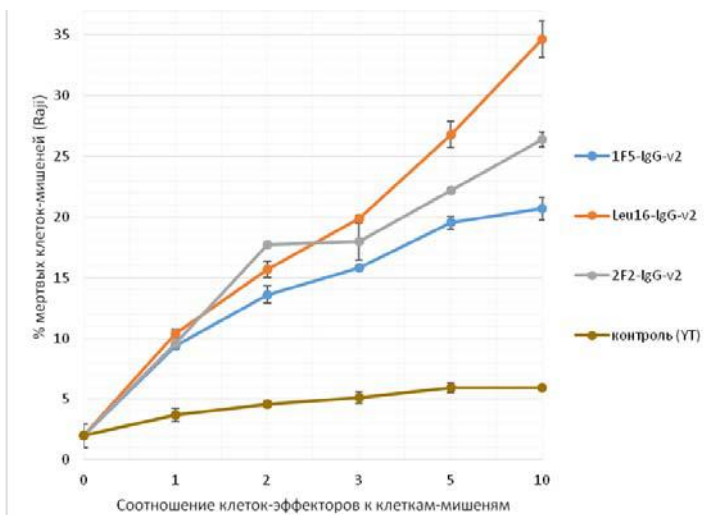


Рис. 2. Уровень цитотоксичности CAR-YT клеток при инкубации с клетками-мишенями в различных соотношениях

Данные эксперименты свидетельствуют о том, что все полученные CD20-специфические CAR функциональны. Кроме того, важно отметить, что 2F2(CD20)-CAR – созданный нами впервые – характеризуется наиболее удачным соотношением уровней специфической и неспецифической активации *in vitro*, что в сочетании с полностью «человеческой» последовательностью делает его более предпочтительным кандидатом для дальнейших испытаний в контексте первичных T-клеток человека и на мышиных моделях.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ МЕЛАНОМЫ**THERAPEUTIC VACCINE AGAINST MELANOMA**

Е.А. Боробова, Д.В. Антонец, Е.В. Старостина, С.Ф. Орешкова,
Д.Н. Щербаков, О.Ю. Смирнова, С.И. Бажан, А.А. Ильичев, Л.И. Карпенко,
Е.Д. Даниленко, С.Г. Гамалей, С.В. Усова, М.П. Богрянцева

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

E.A. Borobova, D.V. Antonets, E.V. Starostina, S.F. Oreshkova,
D.N. Shcherbakov, O.Yu. Smirnova, S.I. Bazhan, A.A. Ilyichev, L.I. Karpenko,
E.D. Danilenko, S.G. Gamalei, S.V. Usova, M.P. Bogryantseva

SRC VB «Vector», Russia

e-mail: borobova-elena@rambler.ru

Аннотация

Меланома является наиболее агрессивным и опасным раком кожи, отличается быстрыми темпами роста и высокой частотой формирования метастазов. Для клеток меланомы характерно присутствия раковых антигенов на поверхности. В связи с этим существует возможность создания эффективной терапевтической вакцины против меланомы.

Abstract

Melanoma is the most aggressive and dangerous skin cancer. It's characterized by rapid growth rates and high incidences of metastasis. Melanoma cells have tumor antigens on their surfaces. Thereby, it's possible to create an effective therapeutic vaccine against melanoma.

Меланома – самый агрессивный рак кожи. По данным ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» РАМН, на долю меланомы приходится всего 4 % злокачественных новообразований кожи, но до 80 % летальных исходов. Высокая смертность и низкая эффективность лечения связаны с ранним метастазированием и формированием резистентности к классическим методам терапии [1].

Высокая иммуногенность меланомных опухолей, обусловленная присутствием на поверхности клеток раковых антигенов (Melan-A/MART-1, gp100, тирозиназа, MAGE-3 и NY-ESO-1 и др.), дает надежду для создания эффективной терапевтической вакцины или разработки эффективной иммунотерапевтической стратегии, использующей последние достижения молекулярной иммунологии и клеточных технологий [2, 3]. Привлекательным и перспективным подходом к лечению больных с онкологическими заболеваниями является ДНК-вакцинация, индуцирующая цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты, которые являются главными эффекторными клетками противоопухолевого иммунитета [4, 5].

Цель исследования: дизайн, конструирование и изучение экспрессии в эукариотических клетках рекомбинантной ДНК-вакцины, кодирующей полиэпитопный иммуноген для индукции специфического Т-клеточного иммунного ответа против клеток меланомы. Проведение доклинических испытаний вакцины pMel-TCI.

Материалы и методы. Теоретический дизайн ДНК-вакциновой конструкции, кодирующей «аллелеспецифический» полиэпитопный Т-клеточный иммуноген MEL-TCI, проводился с помощью программ TEPredict и PolyCTLDesigner. Ген, кодирующий целевой иммуноген был синтезирован и клонирован в составе векторной плазмиды pcDNA3.1. Подлинность полученной рекомбинантной плазмиды pMEL-TCI была подтверждена с использованием рестрикционного анализа и секвенирования.

Исследование экспрессии целевого гена в клетках НЕК 293 осуществлялось с применением методов внутриклеточного окрашивания продукта экспрессии специфическими МАТ 29F2 к белку-маркеру p24, ОТ-ПЦР и иммуноблоттинга. Изучение специфической активности плазмиды pMEL-TCI проводилось в системе *ex vivo* с использованием моноклеаров периферической крови. Определение иммуногенности плазмиды pMEL-TCI определяли с применением метода проточной цитофлюориметрии. Цитотоксическая активность CD8⁺ Т-лимфоцитов оценивалась с помощью калориметрического метода по высвобождению фермента ЛДГ клетками меланомы.

В результате была сконструирована, и наработана в препаративном количестве плазида pMEL-TCI, кодирующая Т-клеточные эпитопы антигенов меланомы. Получены данные, подтверждающие экспрессию гена MEL-TCI в клетках НЕК 293. Экспериментально была продемонстрирована специфическая активность вакцины pMEL-TCI. Результаты исследований свидетельствуют – ДНК-вакцина индуцирует статистически значимые ответы CD8⁺ Т-лимфоцитов, которые вызывают лизис клеток меланомы MEL Is. При этом цитотоксическая активность эффекторных Т-лимфоцитов достоверно превосходила цитотоксический ответ, индуцированный

плазмидами pcDNA3.1 (отрицательный контроль) и pcDNA-*mart1* (положительный контроль).

Проведенные на мышах и морских свинках доклинические исследования вакцины pMEL-TCI показали отсутствие токсических и иммунотоксических свойств, отсутствие отрицательного влияния на репродуктивную функцию и отсутствие мутагенного эффекта в тесте Еймса. Исследования на кроликах показали, что вакцина не является пирогенной. Таким образом, в результате проведенных доклинических исследований было показано, что вакцина pMEL-TCI не оказывает отрицательного воздействия физиологические, биохимические и морфологические показатели у иммунизированных животных и является полностью безопасной для применения в клинической практике.

Литература

1. Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Современный взгляд на лекарственное лечение диссеминированной меланомы кожи. (Практ. рекомендации общества онкологов-химиотерапевтов по диагностике, лечению и наблюдению больных меланомой кожи) // Практическая онкология. 2012. № 13. С. 143–149.
2. Arenberger P., Fialova A., Gkalpakiotis S., Pavlikova A., Puzanov I. and Arenbergerova M. Melanoma antigens are biomarkers for ipilimumab response // Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2017. Vol. 31. P. 252–259.
3. Pitcovski J., Shahar E., Aizenshtein E. and Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers // Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2017. Vol. 115. P. 36–49.
4. Fioretti D., Iurescia S., Fazio V.M. and Rinaldi M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer // BioMed Research International. 2010. Vol. 2010. P. 1–16.
5. Liu M.A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future // Immunological reviews. 2011. Vol. 239. P. 62–84.

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ СЕЛЕНОЦИСТЕИН- СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ SELV, SELW И TGR В НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ СЕМЕННИКОВ И ПРОСТАТЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ*

CLONING, EXPRESSION OF mRNA OF THE GENES CODING
SELENOCYSTEINE-CONTAINING PROTEINS SELV, SELW AND TGR
IN NORMAL AND CANCER TESTICLE AND PROSTATE CELL LINES

Е.Г. Варламова, М.В. Гольтяев

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биофизики клетки РАН*

E.G. Varlamova, M.V. Goltyaev

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences

e-mail: 1928lv@mail.ru

Аннотация

Селен – незаменимый микроэлемент, дефицит которого приводит к развитию ряда серьезных заболеваний, в том числе к мужской фертильности, раку простаты, злокачественным образованиям яичек и др. Селеноцистеин-содержащие белки млекопитающих SELV, SELW и TGR являются наименее изученными селенопротеинами млекопитающих, локализующихся в семенниках. В рамках данной работы методом ПЦР в реальном времени проведена количественная оценка степени экспрессии мРНК генов *selv*, *selw* и *tgr*, кодирующих селенопротеины человека и мыши в нормальных и раковых клеточных линиях семенников и простаты, а также методом Вестерн-блоттинга установлено наличие исследуемых белков в данных клетках.

Abstract

Selenium is a necessary trace element, the deficiency of which leads to the development of a number serious diseases, including male fertility, prostate cancer, malignant testicles, etc. Selenocysteine- containing mammalian proteins SELV, SELW and TGR are the least studied mammalian selenoproteins localized in the testes. As part of this

* Работа поддержана грантом РФФИ №17-04-00356А и стипендией Президента РФ молодым ученым и аспирантам СП-2059.2016.4.

work, the quantitative evaluation of *selv*, *selw* and *tgr* genes mRNA expression level in normal and cancer cell lines has been carried out by real-time PCR and the presence of these proteins in these cells was determined by Western blotting.

В последние годы накапливается всё больше информации о роли селеноцистеин-содержащих белков млекопитающих в процессах, связанных с канцерогенезом, ключевая роль в которых принадлежит микроэлементу Se, большинство эффектов которого связано с его присутствием в селенопротеинах в качестве аминокислоты Sec, по этой причине исследование роли Se посредством селенопротеинов, как антиоксидантов, представляет огромный научный интерес.

Методом ПЦР в реальном времени нами выявлено наличие экспрессии мРНК генов всех трех исследуемых селенопротеинов в клетках семенников линии *Hst. Tes.*, что согласуется с ранее полученными данными о наличии локализации этих белков в семенниках млекопитающих. При этом наибольший уровень экспрессии характерен для мРНК гена, кодирующего TGR. Также показано, что ген *selv* экспрессируется исключительно в данной клеточной линии, очень слабый сигнал его экспрессии был зафиксирован в клетках простаты *PWR-1E*. Установлено, что ген, кодирующий селенопротеин SELW, экспрессируется во всех исследуемых клеточных линиях, причем в клетках тератоканциномы тестикулярной линии *F-9* уровень его экспрессии оказался немного выше, чем в нормальных клетках семенников, а в раковых и здоровых клетках простаты, данный уровень экспрессии приблизительно одинаковый. В случае с TGR белком, полученные результаты свидетельствуют о наличии экспрессии его гена в нормальных и в раковых клетках тестикул, причем уровень экспрессии данного гена в здоровых клетках в несколько раз превышает таковой в опухолевых *F-9*. В раковой клеточной линии *PC-3* (аденокарцинома простаты человека) выявлен подобный уровень экспрессии гена данного белка, как и в клетках линии *F-9*, однако в нормальных клетках простаты (линия *PWR-1E*) наблюдалось отсутствие такой экспрессии. Результаты данной серии экспериментов отражены на рис. 1.

Для подтверждения результатов, полученных методом ПЦР в реальном времени, был выполнен Вестерн-блот анализ, позволяющий установить наличие селенопротеинов SELV, SELW и TGR в исследуемых клеточных линиях. Для решения данной задачи нами были предварительно получены поликлональные кроличьи антитела против изучаемых белков, для чего сначала были получены очищенные с помощью аффинной хроматографии их рекомбинантные формы в препаративном количестве. Результаты Вестерн-блот анализа отражены на рис. 2 и согласуются с данными, полученными путем ПЦР в реальном времени.

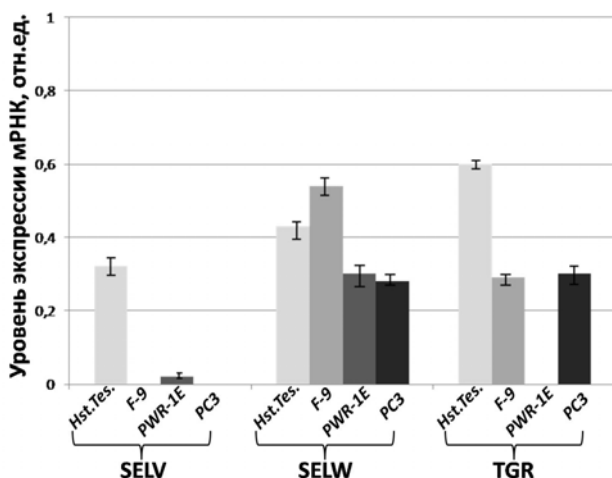


Рис. 1. Уровень экспрессии генов, кодирующих селеноцистеин-содержащие белки SELV, SELW и TGR в нормальных и раковых клеточных линиях семенников и простаты млекопитающих, $n=3$. *Hst.Tes* – нормальные фибробласты семенников человека, *F-9* – клетки тератокарциномы тестикулярной мыши, *PWR-1E* – нормальные эпителиальные клетки простаты человека, *PC3* – клетки аденокарциномы простаты человека

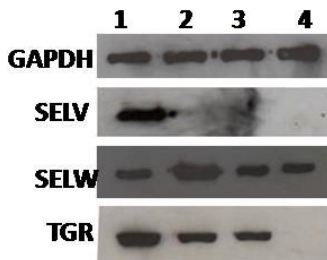


Рис. 2. Выявление наличия селеноцистеин-содержащих белков SELV, SELW и TGR в нормальных и раковых клеточных линиях семенников и простаты млекопитающих с помощью Вестерн-блот анализа. Локализацию белков определяли в следующих клеточных лизатах: 1 – *Hst.Tes* – нормальные фибробласты семенников человека; 2 – *F-9* – клетки тератокарциномы тестикулярной мыши; 3 – *PC3* – клетки аденокарциномы простаты человека; 4 – *PWR-1E* – нормальные эпителиальные клетки простаты человека. В качестве контроля для выполнения количественной оценки белков в клеточных лизатах, использовали антитела против белка GAPDH (глицеральдегид-3-дегидрогеназа), кодируемого геном «домашнего хозяйства»

ИДЕНТИФИЦИЯ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В СИНТЕЗ МЕЛАНИН-ПОДОБНЫХ ПИГМЕНТОВ ЗЛАКОВЫХ РАСТЕНИЙ *

IDENTIFICATION OF GENES, INVOLVED IN MELANIN-LIKE PIGMENTATION IN CEREALS

А.Ю. Глаголева^{1, 2}, Н.А. Шмаков^{1, 2}, О.Ю. Шоева², Г.В. Васильев²,
Н.В. Шацкая², А. Бернер³, Д.А. Афонников^{1, 2}, Е.К. Хлесткина^{1, 2}

¹ *Новосибирский Государственный Университет, Новосибирск, Россия*

² *Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

³ *Институт генетики растений и исследований
культурных растений им. Лейбница, Гатерслебен, Германия*

A.Y. Glagoleva^{1, 2}, N.A. Shmakov^{1, 2}, O.Y. Shoeva², G.V. Vasiliev²,
N.V. Shatskaya², A. Börner³, D.A. Afonnikov^{1, 2}, E.K. Khlestkina^{1, 2}

¹ *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

² *Institute of Cytology and Genetics, The Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

³ *Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK),
Gatersleben, Germany*

e-mail: glagoleva@bionet.nsc.ru

Аннотация

У некоторых видов растений встречается признак черной меланин-подобной окраски семян. Химическая и генетическая природа данного меланин-подобного пигмента до сих пор не изучена из-за его сложной структуры и устойчивости к действию растворителей. Идентификация генетических сетей, участвующих в формировании данного признака лежит в основе понимания метаболических процессов, которые связаны его формированием. Целью данного исследования был анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в изогенных линиях ячменя, различных по окраске семян.

* Исследование поддержано Российским Научным Фондом (No 16-14-00086).

Abstract

Some plant species have ‘melanin-like’ black pigmentation of seed. But the chemical and genetic nature of this ‘melanin-like’ black pigment has not been explored yet, because of its complex structure and ability to withstand almost all solvents. Identification of genetic networks participating in trait formation is a key to understanding metabolic processes involved. The aim of the current study was to identify differentially expressed genes (DEGs) in barley near-isogenic lines (NILs) differing by coloration of seeds.

На первом этапе исследования мы исключили те метаболические пути, которые связаны с образованием пигментов, в т. ч. путь биосинтеза флавоноидов. Наши данные показали, что уровень экспрессии основных генов биосинтеза флавоноидов в черноокрашенной линии BLP значительно не отличается от контрольной неокрашенной линии Bowman. Следующим шагом является идентификация дифференциально экспрессирующихся генов в изогенных линиях ячменя методом RNA-seq. На данный момент идентифицировано 632 гена с повышенной экспрессией в линии BLP и 325 генов с повышенной экспрессией в линии Bowman. Также были идентифицированы те метаболические пути, в которых встречаются ДЭГ. Гены с повышенной экспрессией в BLP были выявлены в таких метаболических путях как: биосинтез суберина, фитоалексинов, кутикулярных восков и т. д. Исходя из количества и разнообразия метаболических путей, в которые вовлечены ДЭГ, мы сделали вывод о плеiotропном действии гена *Blp*, который связан с формированием черной окраски семян (возможно, за счет действия фермента полифенол оксидазы), с противодействием окислительному стрессу (за счет повышенного содержания антиоксидантов, в т. ч. феруловой кислоты), с повышенной устойчивостью к фузариозу колоса (за счет синтеза фитоалексинов и кутикулярных восков).

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ АДЪЮВАНТНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО *

PERSONALIZED ADJUVANT CHEMOTHERAPY IN TREATMENT OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER

И.В. Дерюшева, Е.О. Родионов, М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова,

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Томский национально исследовательский медицинский центр
Российской академии наук», Томск, Россия*

I.V. Deryusheva, E.O. Rodionov, M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova

Cancer Research Institute, Tomsk NRMC

Аннотация

Рак легкого является одним из наиболее распространенных злокачественных опухолей в мире с самой высокой заболеваемостью и смертностью. Местнораспространенная форма или III стадия болезни встречается у 30 % пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Лечение III стадии НМРЛ остается сложной и противоречивой задачей, что большей частью связано с разными степенями распространенности первичной опухоли, объединенными в III стадию по классификации TNM. Традиционно местнораспространенный рак разделяют на IIIA стадию с 24 %-й 5-летней выживаемостью и IIIB стадию с неблагоприятным прогнозом и 9 %-й 5-летней выживаемостью [Crinò L. et al., 2010].

Несмотря на постоянное совершенствование хирургического метода, заметной тенденции к улучшению данных выживаемости не наблюдается. У подавляющего большинства больных с III стадией (35–50 %) прогрессирование процесса происходит за счет развития отдаленных метастазов, поэтому назначение системной химиотерапии преследует цель предотвращения диссеминации процесса. Применение стандартных и разработка новых схем химиотерапии в значительной мере исчерпали свои возможности в плане повышения эффективности лечения. Основным препятствием на этом пути является недостаточно эффек-

* Исследования выполнены при поддержке программы «Участники молодежного научно-инновационного конкурса (УМНИК)» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере. Договор (Соглашение) №11783 ГУ/2017 от 3 июля 2017 г. Тема: «Разработка способа предсказания эффективности послеоперационной химиотерапии у больных раком легкого».

тивный выбор химиопрепаратов и тактики лечения конкретного больного, основанный на использовании стандартных клинических, прогностических и предсказательных критериев [Цыганов и др., 2015]. Таким образом, целью работы явилось улучшение результатов комбинированного лечения немелкоклеточного рака легкого III стадии за счет использования персонализированного назначения адъювантной химиотерапии на основании уровня экспрессии генов химиочувствительности.

Abstract

Lung cancer is one of the most common malignant tumors in the world with the highest incidence and mortality. In 30 % of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) there is a locally advanced form or stage III of the disease. Treatment of stage III NSCLC remains a complex and controversial task, which is mainly associated with different degrees of primary tumor prevalence, combined in the third stage according to TNM classification. Traditionally, locally advanced cancer is divided into stage IIIA with 24 % 5-year survival and IIIB stage with unfavorable prognosis and 9 % 5-year survival [Crinò L. et al., 2010].

A marked tendency to improve survival data is not observed, despite the continuous improvement of the surgical technique. In the vast majority of patients with Stage III (35–50 %), the progression of the process is due to the development of distant metastases, therefore the purpose of systemic chemotherapy is to prevent dissemination of the process. The use of standard and the development of new chemotherapy regimens have largely exhausted their ability to improve the effectiveness of treatment. The main obstacle in this way is the ineffective selection of chemotherapy and treatment tactics for a particular patient, based on the use of standard clinical, prognostic and predictive criteria [Tsyganov M.M. et al., 2015]. Thus, the aim of the work was to improve the results of combined treatment of non-small cell lung cancer stage III through the use of a custom appointment adjuvant chemotherapy based on gene expression level chemosensitivity.

Материалы и методы

Всего в исследовании были проанализированы результаты лечения 66 больных немелкоклеточным раком легкого III стадии с морфологически верифицированным диагнозом, находившихся на лечении в торако-абдоминальном отделении НИИ онкологии Томского НИМЦ. Пациенты были распределены на две группы: основную группу составили 30 пациентов, контрольную – 36. Пациентам обеих групп проводилось 2 курса предоперационной химиотерапии по схеме винорелбин\карбоплатин и радикальное хирургическое вмешательство. После пациентам основной группы было проведено 3 курса адъювантной химиотерапии, назначенной на основании оценки уровней экспрессии генов *ABCC5*, *RRM1*, *ERCC1*, *BRCA1*, *TOP1*, *TOP2a*, *TUBB3* и *TYMS* в опухолевой ткани легко-

го, а больным контрольной группы послеоперационная химиотерапия проводилась по стандартной схеме винорелбин\карбоплатин. В качестве исследуемого материала были использованы опухолевые образцы нормальной и опухолевой ткани легкого после НХТ. РНК выделяли из 66 парных образцов с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany). Уровень экспрессии исследуемых генов оценивали при помощи количественной обратной-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени относительно нормальной ткани легких [Юмов Е.Л. и др., 2014]. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0». Для анализа безрецидивной и общей выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера.

Результаты

Был оценен уровень экспрессии исследуемых генов химиочувствительности в опухолевой ткани легкого. В зависимости от уровня экспрессии определялась чувствительность опухоли к конкретным химиопрепаратам. Для препаратов платины и таксанов важен уровень *ERCC1* и *BRCA1*; для гемцитабина, 5- фторурацила, капецитабина – *RRM1*, *ABCC5*, *TYMS*; *TOP1* и *TOP2a* – иринотекан и доксорубицин, соответственно; *TUBB3* – винорелбин. Далее на основе этого назначалась персонализированная схема химиотерапии.

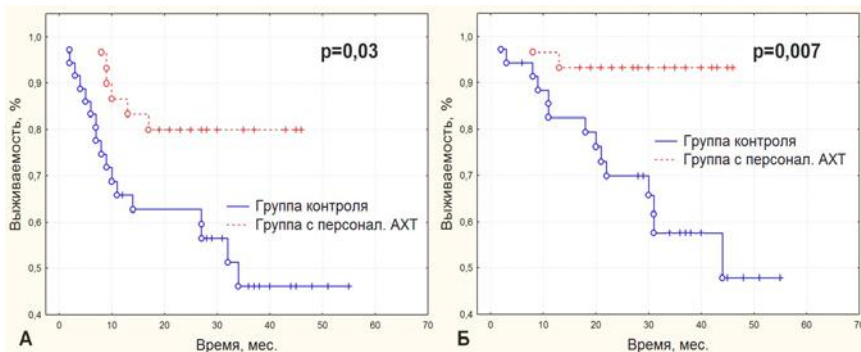


Рис. 1. Безрецидивная (А) и общая (Б) выживаемость больных НМРЛ в группе с персонализированной АХТ и группе контроля

Для оценки отдаленных результатов комбинированного лечения была изучена безрецидивная и общая выживаемость больных в обеих группах. Было установлено, что выживаемость в группе больных с персонализированным назначением АХТ статистически значимо выше по сравнению с группой исторического контроля. Трехлетней безрецидивная выживаемость

увеличилась на 34 % ($p = 0,03$), (рис. 1, *а*); показатели общей выживаемости возросли на 36 % ($p = 0,007$), (рис. 1, *б*).

Выводы

На сегодняшний день персонализация химиотерапии остается важной и актуальной проблемой для немелкоклеточного рака легкого, решение которой может способствовать значительному повышению эффективности терапии НМРЛ. Как было показано во многих исследованиях, гены химиочувствительности являются важными предиктивными маркерами для персонализации химиотерапии больным раком легкого.

Стоит отметить, что с увеличением выборки больных основной группы, которое продолжается, будет увеличиваться и прирост безрецидивной и общей выживаемости.

Литература

1. Crinò L., Weder W., van Meerbeeck J et al. Early stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. // *Ann Oncol.* 2010. S. 5. P. 103–115.
2. Цыганов М.М., Родионов Е.О., Миллер С.В., Литвяков Н.В. Обоснование использования экспрессионных маркеров для персонализации химиотерапии рака легкого // *Антибиотики и химиотерапия.* 2015. № 9-10. С. 34–42.
3. Юмов Е.Л., Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Полищук Т.В., Миллер С.В., Родионов Е.О., Тузиков С.А. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и монорезистентности при немелкоклеточном раке легкого // *Сибирский онкологический журнал.* 2014. № 1 (61). С. 16–22.

АНАЛИЗ НЕЗАРЯЖЕННЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА *

ANALYSIS OF NON-CHARGED OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES BY USING GEL-ELECTROPHORESIS

Е.С. Дюдеева, А.С. Павлова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

E.S. Dyudeeva, A.S. Pavlova

ICBFM SB RAS, Russia

Аннотация

Среди многообразия синтетических олигонуклеотидов выделяют незаряженные олигонуклеотидные конструкции, в структуре которых сохранены азотистые основания, однако отрицательно заряженный углеводофосфатный остов заменён на электронейтральный. В данной работе продемонстрирована возможность анализировать такие соединения при помощи гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

Abstract

Among the variety of sintetical oligonucleotides, the most interesting are non-charged oligonucleotide constructions. Their structure keeps the nitrogenous bases, but the negatively charged backbone is replaced by an electroneutral one. This paper demonstrates a possibility to analyse these chemical compounds by using gel-electrophoresis in presence of sodium dodecyl sulfate.

Олигонуклеотиды, их производные и аналоги, – возможно, одни из наиболее распространённых инструментов, используемых в биохимии и молекулярной биологии. Появление принципиально новых аналогов и производных олигонуклеотидов влечет за собой всплеск исследований их физико-химических и молекулярно-биологических свойств. В свою очередь разнообразие строения и свойств таких олигонуклеотидных конструкций, наряду с высокими требованиями, предъявляемыми к чистоте ко-

* Работа была выполнена при поддержке гранта РФ 16-15-10238.

нечного продукта, приводят к необходимости развития подходов к эффективному анализу и характеристике продуктов синтеза на разных его этапах. Следует отметить, что такой широко используемый и уже рутинный метод, как гель-электрофорез не всегда может быть применен для изучения аналогов нуклеиновых кислот, углеводофосфатный остов которых при нейтральных pH не имеет заряда. Как правило, «подвижность» в электрофоретических экспериментах незаряженным аналогам придают, модифицируя их несущими заряд остатками или используя их комплексы с комплементарными НК-матрицами [1, 2].

Целью данной работы являлась разработка подхода к анализу полностью незаряженных аналогов НК при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. На примере олигонуклеотидов, содержащих различное число незаряженных групп, были изучены факторы, влияющие на электрофоретическую подвижность рассматриваемых соединений. В качестве незаряженных олигонуклеотидов были выбраны фосфорилгуанидиновые аналоги НК [3] (рис. 1).

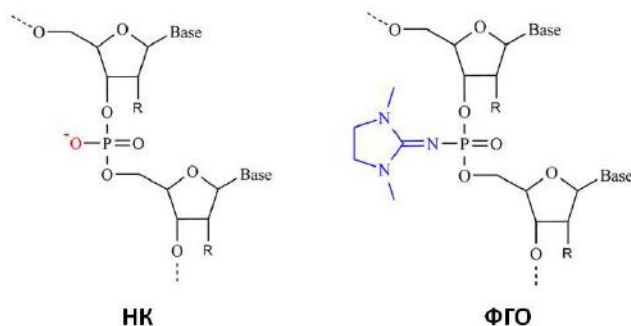


Рис. 1. Структура нуклеиновой кислоты (НК) и ее фосфорилгуанидинового аналога (ФГО)

Было рассмотрено поведение модельных систем на основе декануклеотидов с различным числом фосфорилгуанидиновых групп, а также различных по длине и нуклеотидному составу олигомеров в условиях денатурирующего гель-электрофореза, стандартно применяемого для НК, и в условиях SDS-электрофореза, характерного для изучения белков. Систематические исследования показали, что в условиях SDS гель-электрофореза фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды приобретают эффективный отрицательный заряд, причем относительная подвижность олигомера зависит от концентрации додецилсульфата натрия, длины и нуклеотидной последовательности олигомера, типа остова НК, а также наличия хаотропных агентов в составе геля. Было обнаружено, что уве-

личение длины и, соответственно, массы полностью незаряженного олигомера приводит к увеличению его электрофоретической подвижности в условиях SDS гель-электрофореза, что противоположно поведению подобных по длине олигодезоксирибонуклеотидов в условиях денатурирующего электрофоретического анализа.

Для демонстрации универсальности разрабатываемого подхода была осуществлена визуализация других типов незаряженных аналогов нуклеиновых кислот (морфолиновых (МО) и пептидилнуклеиновых (ПНК) аналогов) в условиях SDS-гель-электрофореза (рис. 2).

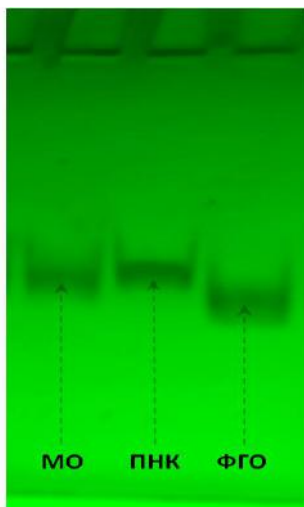


Рис. 2. Результат электрофоретического разделения незаряженных аналогов олигонуклеотидов в присутствии SDS

Таким образом, электрофоретическая подвижность полностью незаряженных аналогов олигонуклеотидов продемонстрирована впервые.

Список литературы

1. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B., and Nielsen, P. E., *Nature*, 1993, 365, P. 566–568. (doi: 10.1038/365566a0)
2. Startsev, M. A., Ostrowski, M., Goldys, E. M., Iglis, D. W., *Electrophoresis*, 2017, 38, P. 335–341. (doi: 10.1002/elps.201600358)
3. Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., *Acta Naturae*, 2014, 6, P. 116–118.

**СВЯЗЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ
РОСТА EGFR, TGF- β R1 И VEGFR2 И ПОЛИМОРФНЫХ
ВАРИАНТОВ ИХ ГЕНОВ С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ТЕРАПИИ
ТАМОКСИФЕНОМ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

RELATION OF THE EGFR, TGF- β R1 AND VEGFR2 GROWTH FACTOR
RECEPTORS EXPRESSION AND THEIR POLYMORPHISMS
WITH THE EFFICACY OF TAMOXIFEN TREATMENT
IN BREAST CANCER PATIENTS

Т.А. Дронова^{1,2}, С.В. Паталяк¹

¹ ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук» Научно-исследовательский
институт онкологии, г. Томск, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский
государственный университет», г. Томск, Россия

T.A. Dronova^{1,2}, S.V. Patalyak¹

¹ Federal State Budgetary Scientific Institution "Cancer Research Institute",
Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy
of Sciences, Tomsk, Russian Federation

² National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation

e-mail: tanyadronova@mail.ru

Аннотация

Резистентность к антиэстрогенной терапии является мультифакториальной проблемой, в которой задействовано множество сигнальных путей, в том числе сигнальные каскады рецепторов факторов роста, которые взаимодействуют как с ER α сигнальным путем, так и между собой. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи белковой и генной экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), трансформирующего фактора роста бета I типа (TGF- β R1), сосудистого эндотелиального фактора роста II типа (VEGFR2) и полиморфных вариантов их генов с эффективностью адьювантной терапии тамоксифеном и прогнозом у больных люминальным раком молочной железы (РМЖ). Проведенное исследование указывает на то, что уровень экспрессии mRNA *TGF- β R1*, белковых продуктов генов *EGFR*, *TGF- β R1* и *VEGFR2*, а также полиморфизм *ESR1* (rs2228480) можно рассматривать в качестве до-

полнительных предсказательных критериев эффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном у пациенток с люминальным типом рака молочной железы.

Abstract

Resistance to anti-estrogen therapy is a multifactorial problem in which a variety of signaling pathways are involved, including signaling cascades of growth factor receptors that interact with both the ER α signaling pathway and with each other. The aim of the study was to examine the relationship between the protein and gene expression of receptor epidermal growth factor (EGFR), receptor transforming growth factor β type I (TGF- β RI), receptor vascular endothelial growth factor and their polymorphisms with the tamoxifen response and prognosis in luminal breast cancer patients. Our data suggest that the mRNA expression of *TGF- β RI* as well as EGFR TGF- β RI and VEGFR2 protein expression level and *ESR1* (rs2228480) gene polymorphism can be potential molecular markers of tamoxifen resistance in luminal breast cancer patients.

Актуальность

На сегодняшний день развитие резистентности к антиэстрогенной терапии у больных раком молочной железы (РМЖ) остается актуальной онкологической проблемой. Устойчивость к терапии тамоксифеном может определяться регуляцией мембранными тирозинкиназами ER α сигнального пути [1]. Среди различных мембранных киназ активация рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), трансформирующего фактора роста β I типа (TGF- β RI) и рецепторов сосудистого эндотелиального фактора роста II типа (VEGFR2) имеет решающее значение в механизмах развития эндокринной резистентности [2,3,4]. Однако взаимосвязь выше перечисленных рецепторов факторов роста, как на уровне их генетических особенностей, так и особенностей белковой экспрессии с эффективностью терапии тамоксифеном у больных люминальным РМЖ остается в настоящее время недостаточно изученной.

Цель работы

Изучение взаимосвязи белковой и генной экспрессии EGFR, TGF- β RI, VEGFR2 и полиморфных вариантов их генов с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном и прогнозом у больных люминальным РМЖ.

Материалы и методы

В исследование включены 104 пациентки с впервые выявленным операбельным эстроген-позитивным раком молочной железы, находившихся на лечении в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2002 по 2014 гг.. Возраст больных варьировал от 30 до 79 лет,

средний – $54,5 \pm 0,9$ лет. У всех больных диагноз рака молочной железы был подтвержден морфологически. Пациентки получали комбинированное лечение в объеме оперативного вмешательства, а также лучевой и химиотерапии по показаниям. Обязательным компонентом адъювантного лечения для всех больных являлся прием тамоксифена в течение 5 лет в стандартной дозировке (20 мг/сутки). Согласно результатам лечения, по факту наличия прогрессирования заболевания на фоне приема тамоксифена в виде отдаленных метастазов, были сформированы две исследуемые группы: без признаков прогрессирования (тамоксифен-чувствительная группа), с прогрессированием заболевания (тамоксифен-резистентная подгруппа). Материалом для исследования служили образцы опухолевой и прилежащей нормальной ткани. Анализ экспрессии mRNA *EGFR*, *TGF-βR1*, *VEGFR2*, полиморфных локусов *EGFR* (rs1468727), *TGF-βR1* (rs334354), *VEGFR2* (rs2071559, rs2305948), а также *ESR1* (rs2228480, rs2077647) проведен с помощью ПЦР в режиме реального времени. Уровень белковой экспрессии *EGFR*, *TGF-βR1*, *VEGFR2* изучен иммуногистохимическим методом. Общая выживаемость больных РМЖ анализировалась с помощью кривых Каплана-Мейера и теста логарифма рангов. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы “STATISTICA 7.0”. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$.

Результаты

При оценке отдаленных результатов лечения тамоксифеном прогрессирование заболевания выявлено у 39 (42,4 %) больных, благоприятный исход заболевания имели 53 (57,6 %) пациентки. Анализ экспрессии мРНК исследуемых генов показал, что для тамоксифен-чувствительной группы больных РМЖ характерен высокий уровень экспрессии гена *TGF-βR1*, по сравнению с тамоксифен-резистентной ($p=0,046$). Соответственно, высокий уровень белковой экспрессии *TGF-βR1* наблюдался у пациенток без прогрессирования заболевания, по сравнению с группой больных, резистентной к тамоксифену ($p=0,043$). Однако противоположная направленность изменений была выявлена при изучении белковой экспрессии *VEGFR2* и *EGFR*. Высокий уровень экспрессии обоих маркеров был характерен для пациенток с прогрессированием заболевания по сравнению с больными тамоксифен-чувствительной группы ($p = 0,042$ и $p = 0,007$).

При изучении связи полиморфных вариантов исследуемых генов с эффективностью терапии тамоксифеном у больных исследуемых групп значимые результаты были получены только для полиморфного локуса гена эстрогенового рецептора *ESR1* 2014G>A (rs2228480). Выявлена ассоциа-

ция как мутантного генотипа *ESR1* 2014AA, так и аллеля *ESR1* 2014AA с резистентностью к терапии тамоксифеном ($p = 0,022$ и $p = 0,018$, соответственно).

Анализ показателей общей выживаемости показал, что пациентки с негативной экспрессией EGFR имели лучшие показатели выживаемости, чем больные с EGFR-позитивными опухолями ($p = 0,006$). Общая выживаемость была значимо меньше у пациенток с *KDR*-604TT (rs2071559) и *KDR* 1192GG (rs2305948) генотипами по сравнению с носительством соответствующих вариантных генотипов ($p=0,015$ и $p=0,034$; соответственно).

Выводы

Анализ экспрессии mRNA *TGF- β 1*, уровня белковых продуктов генов *EGFR*, *TGF- β 1* и *VEGFR2*, а также оценка полиморфных вариантов гена эстрогенового рецептора может быть полезен в плане определения чувствительности опухоли к проводимой терапии тамоксифеном у больных РМЖ.

Литература

1. Chang J., Fan W. Endocrine therapy resistance: Current status, possible mechanisms and overcoming strategies // *Anticancer Agents Med Chem*. 2013. Vol. 3, № 13. P. 464–475.
2. Chen C., Zhao K.N., Masci P.P., Lakhani S.R., Antonsson A., Simpson P.T., Vitetta L. TGF β isoforms and receptors mRNA expression in breast tumours: prognostic value and clinical implications. *BMC Cancer*. 2015. Dec 24; 15: P. 1010.
3. Linderholm B. K., Hellborg H., Johansson U., Lehtio J. Vascular endothelial growth factor receptor 2 and downstream p38 mitogen-activated protein kinase are possible candidate markers of intrinsic resistance to adjuvant endocrine treatment in steroid receptor positive breast cancer // *Breast Cancer Res Treat*. 2011. Vol. 2, № 125. P. 457–65.
4. Xuan Q.J., Wang J.X., Nanding A., Wang Z. P., Liu H., Lian X., Zhang Q.Y. Tumor associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients // *Pathol Oncol Res*. 2014. Vol. 20, № 3. P. 619–24.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИПРОЛЕФИРАТИВНОЙ И ИНТЕРФЕРОН-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОРОТКОЙ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ РНК

MOLECULAR MECHANISMS OF ANTIPROLIFERATIVE AND INTERFERON-INDUCING ACTIVITY OF SHORT IMMUNOSTIMULATING RNA

М.И. Жоров, Т.О. Кабилова, В.В. Власов, М.А. Зенкова, Е.Л. Черноловская

*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СОРАН, Новосибирск*

M.I. Zhorov, T.O. Kabilova, V.V. Vlasov, M.A. Zenkova, E.L. Chernolovskaya
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS

Аннотация

Экзогенные нуклеиновые кислоты способны стимулировать систему врожденного иммунитета в зависимости от их последовательности, структуры, и способа проникновения в организм. Была обнаружена короткая двуцепочечная РНК, проявляющая антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеток *in vitro*, а также противоопухолевую и антиметастатическую активности *in vivo*. Выявленная исРНК не имела значительной гомологии с мРНК генов человека или мыши. Иммуностимулирующая активность РНК может быть использована при лечении опухолевых и вирусных заболеваний.

Abstract

Exogenous nucleic acids are able to activate the innate immune system depending on their structure, sequence and method of delivery. Recently, we discover a short double-stranded RNA that possess pronounced antiproliferative activity in cancer cells *in vitro*, and antitumor, antimetastatic activities *in vivo*. isRNA under study did not have substantial homology to any human or mouse mRNAs. The immunostimulatory activity of RNA can be applied to antiviral and antitumor therapy.

Целью данного исследования являлось выявление клеточных рецепторов, ответственных за антипролиферативную активность исРНК в клетках эпидермоидной карциномы KB-3-1, а также идентификация иммунных

эффекторных клеток в периферической крови человека, опосредующих интерферон-индуцирующую активность исРНК.

Для выявления клеточных рецепторов, опосредующих антипролиферативную активность исРНК, были получены клеточные линии KB-3-1, стабильно экспрессирующие короткие шпилечные РНК (shРНК), направленные на подавление экспрессии генов рецепторов РНК: RIG-I, MDA5 и PKR, а также регулятора транскрипции интерферона IRF3. В качестве контроля использовалась клеточная линия, экспрессирующая shРНК случайной последовательности (shScr).

Результаты показали (рис. 1), что наблюдается достоверное снижение относительного количества живых клеток, экспрессирующих shРНК-Scr и shРНК-IRF3, под действием исРНК в комплексе с трансфекционным агентом 2X3:DOPE, по сравнению с клетками, обработанными только 2X3:DOPE. В клетках, экспрессирующих shРНК против генов PKR, MDA5 и RIG-I, достоверного снижения количества живых клеток под действием исРНК не наблюдается. Полученные данные свидетельствуют о том, что исРНК проявляет свою антипролиферативную активность, действуя, по-видимому, через PKR, MDA5 и RIG-I рецепторы.

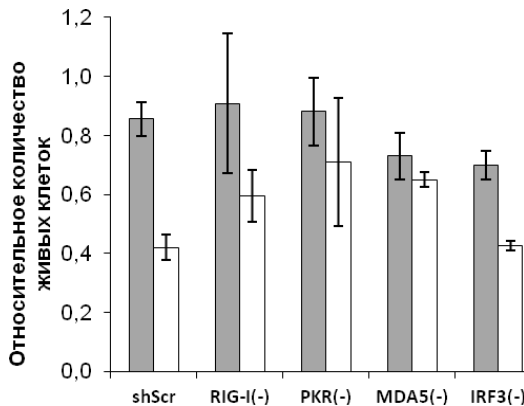


Рис. 1. Влияние исРНК на пролиферацию клеточных линий KB-3-1, стабильно экспрессирующих shРНК, направленные на подавление экспрессии генов IRF3, RIG-I, MDA5 и PKR. Клетки трансфицировали исРНК в комплексе с 2X3:DOPE (белые столбцы) или только 2X3:DOPE (серые столбцы). Количество живых клеток через 120 часов после трансфекции было взято за 1. Приведено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, рассчитанное на основании двух измерений

Участие PKR во внутриклеточных сигнальных каскадах, активированных исРНК, подтверждается результатами, полученными с использованием специфического ингибитора протеинкиназ, 2-аминопурина. Было пока-

зано (данные не приведены), что предварительная обработка клеток KB-3-1 2-аминопурином, полностью блокирует антипролиферативную активность исРНК.

Для определения клеток-эффекторов исРНК, индивидуальные типы иммунных клеток (Натуральные клетки, Т, В лимфоциты, дендритные клетки, моноциты и макрофаги) были выделены путем иммуномагнитной сорбции. Исследование интерферон-индуцирующей активности исРНК в отношении разных типов иммунных клеток человека показало (рис. 2), что дендритные клетки и моноциты продуцируют ИФН- α в ответ на исРНК, тогда как натуральные киллеры, Т, В лимфоциты и зрелые макрофаги не секретируют ИФН- α .

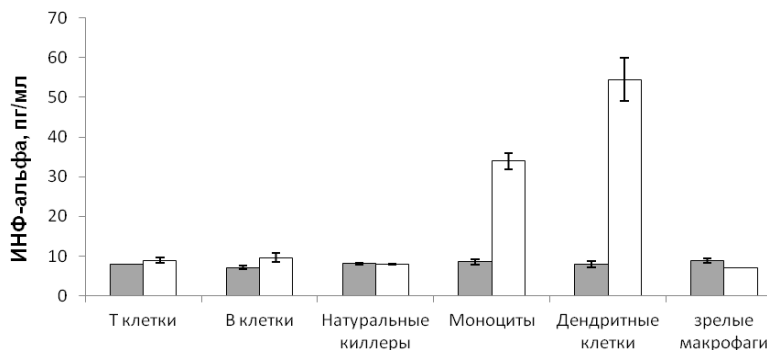


Рис. 2. Индукция ИФН- α в культуральной среде индивидуальных типов иммунных клеток препаратами исРНК в комплексе с 2X3:DOPE (белые столбцы) или только 2X3:DOPE (серые столбцы). Уровень ИФН- α определяли через 24 часа после трансфекции с помощью ИФА. Приведено среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, рассчитанное на основании двух измерений

Таким образом, эффекторными клетками, опосредующими иммуностимулирующую активность исРНК, являются антиген-представляющие клетки врожденного и приобретенного иммунитета, а именно: дендритные клетки и моноциты.

Таким образом, можно предположить, что исРНК проявляет противоопухолевую активность *in vivo*, действуя согласно двум механизмам:

- 1) ингибирует пролиферацию опухолевых клеток посредством паттерн-распознающих рецепторов, таких как: RIG-I, MDA5 и PKR;
- 2) стимулирует иммунный ответ против опухоли путем индукции синтеза цитокинов, в том числе интерферонов первого типа.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант No 16-15-10105).

**ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ АНАЛОГОВ МАЛЫХ ЯДЕРНЫХ
И МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ***

**WHOLE-TRANSCRIPTOME STUDY OF FUNCTIONING
OF SMALL NUCLEAR AND SMALL NUCLEOLAR RNA
ANALOGUES IN HUMAN CELLS**

Е.С. Журавлев^{1,2}, Г.А. Степанов^{1,2}, В.О. Шендер³, Г.П. Арапиди³,
К.С. Ануфриева³, А.А. Нуштаева¹, Е.А. Балахонова¹, Е.В. Можаяева^{1,2},
Р. Шах Махмуд⁴, С.Ю. Маланин⁴, Т.В. Григорьева⁴,
В.М. Говорун³, Д.В. Семенов¹, В.А. Рихтер¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

³ *Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва*

⁴ *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань*

E.S. Juravlev^{1,2}, G.A. Stepanov^{1,2}, V.O. Shender³, G.P. Arapidi³,
K.S. Anufrieva³, A.A. Nushtaeva, E.A. Balahonova¹, E.V. Mozhaeva^{1,2},
R. Shah Mahmud⁴, S.J. Malanin⁴, T.V. Grigoreva⁴,
V.M. Govorun³, D.V. Semenov¹, V.A. Richter¹

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³ *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic
Chemistry RAS, Moscow, Russia*

⁴ *Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia*

e-mail: stepanovga@niboch.nsc.ru

* Исследование было поддержано грантами РФФИ 16-04-01414, 16-34-60136, РНФ 16-14-10284.

Аннотация

Малые ядерные РНК и малые ядрышковые РНК (мяРНК, мяоРНК) являются участниками центральных процессов созревания клеточных РНК. В данной работе при помощи Ψ/m_5C -модифицированных аналогов мяРНК и мяоРНК удалось выявить функциональные группы генов, экспрессия которых изменялась под действием каждого из исследуемых РНК. Полученные данные позволили предложить молекулярные пути функционирования аналогов нкРНК в клетках человека.

Abstract

Small nuclear and small nucleolar RNA (snRNA, snoRNA) are the key trans-factors of post-transcriptional maturation of cellular RNAs. In the current work, using the Ψ/m_5C -modified analogues of snRNA and snoRNA, functional groups of genes, the expression of which changed under the influence of each of the investigated RNAs, were determined. The obtained data allowed to suggest molecular pathways of functioning of ncRNA analogues in human cells.

Малые ядерные РНК (мяРНК) и малые ядрышковые РНК (мяоРНК) являются яркими представителями многочисленного класса некодирующих РНК. Эти РНК в составе рибонуклеопroteидных комплексов участвуют в центральных процессах созревания клеточных РНК. мяРНК являются каталитическими и структурными компонентами сплайсосом, осуществляющих сплайсинг предшественников матричных РНК. В свою очередь мяоРНК регулируют созревание предшественников рРНК, в частности, представители семейства C/D-бокс-мяоРНК направляют 2'-О-метилирование нуклеотидов рРНК.

В настоящее время широко известно, что зрелые формы многих классов нкРНК содержат помимо канонических мономеров модифицированные нуклеотиды. Наиболее распространенными являются нуклеотиды, метилированные по остатку рибозы или основания, и псевдоуридины (Ψ). Предполагается, что модификации нуклеотидов в совокупности стабилизируют вторичную структуру молекулы РНК, а также контролируют прочность межмолекулярных взаимодействий с другими РНК и белками в сложных надмолекулярных комплексах.

Целью данной работы является изучение функционирования Ψ/m_5C -модифицированных аналогов мяРНК и мяоРНК в клетках человека. Ранее было установлено, что в клетках MCF-7, трансфицированных немодифицированными аналогами C/D-бокс-мяоРНК, происходит повышение уровня транскрипции группы генов интерферонового ответа и генов апоптотического каскада, которое характеризует неспецифический иммуностимулирующий эффект РНК [1]. Кроме того, известно, что наличие в структуре

аналогов 5'-трифосфата значительно усиливает индукцию врожденного иммунного ответа в клетках человека. Существенное повышение уровня экспрессии интерферон-чувствительных генов обуславливает цитотоксическое действие аналогов нкРНК, которое препятствует выявлению путей сиквенс-специфического действия таких аналогов. Для подавления неспецифического иммунного ответа в данной работе была выбрана стратегия включения модифицированных нуклеотидов в состав аналогов мяРНК и мяоРНК.

С помощью транскрипции *in vitro* были получены 5'-кэпированные РНК-конструкции с последовательностями природных U25, U35a, U74 и U78 C/D-бокс-мяоРНК, а также U6atac и U12 мяРНК человека, содержащие m_5C и Ψ . Используя флуоресцентно меченные аналоги этих РНК было установлено, что при трансфекции с липидным трансфектантом полноразмерные аналоги детектируются после 24 часов инкубации как в цитоплазме, так и в ядрах клеток. Кроме того, было обнаружено, что замещение U на Ψ увеличивает эффективность накопления РНК в клетках (рис. 1).

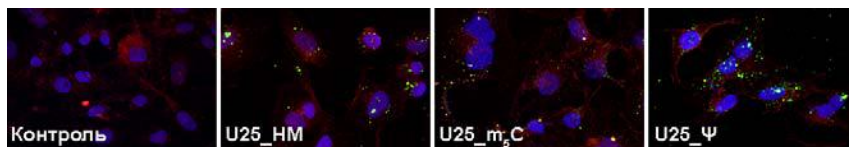


Рис. 1. Локализация аналогов U25 мяоРНК в клетках SK-OV-3. Изображения трансфицированных аналогами и контрольных клеток, полученные в результате конфокальной микроскопии, являются наложением трех каналов: зеленого (флуоресценция FITC), синего (флуоресцентная окраска ядер с помощью Hoechst) и красного (флуоресцентная окраска F-актина с помощью Alexa Fluor 594 phalloidin). “НМ” – немодифицированный аналог нкРНК; “ Ψ ”, “ m_5C ”, – аналоги, синтезированные в транскрипционных смесях с полной заменой UTP на Ψ TP, CTP на m_5 CTP, соответственно; “Контроль” – клетки, обработанные только трансфицирующим агентом

В ходе трансфекции аналогов мяРНК и мяоРНК в клетки человека было установлено, что введение в структуру коротких нкРНК Ψ и m_5C существенно снижает как иммуностимулирующее, так и цитотоксическое действие РНК-конструкций. Далее для оценки неспецифических эффектов аналогов нкРНК была выбрана культура клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7; для выявления процессов, уникальных для каждой РНК, – линия клеток аденокарциномы яичников SK-OV-3. Изменения в экспрессии генов на обеих моделях были проанализированы с помощью метода высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina.

На первой модели было выявлено, что Ψ и m_5C обеспечивают схожий эффект в подавлении иммуностимулирующей активности синтетических РНК (рис. 2), предположительно, за счет нарушения взаимодействия аналогов нкРНК с паттерн-распознающими рецепторами на поверхности и внутри клеток.

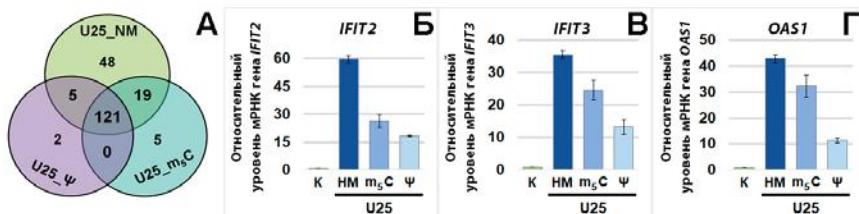


Рис. 2. А – Сравнение наборов генов с повышенной экспрессией через 24 ч. после трансфекции аналогов U25 мяоРНК в клетки MCF-7. Представлены диаграммы сравнения (диаграмма Венна) наборов генов, уровень мРНК которых достоверно отличается в контрольных и трансфицированных клетках (Diff pValue < 0.05) по результатам анализа данных дифференциальной экспрессии. Б-Г – Уровень мРНК генов IFIT2 (Б), IFIT3 (В), OAS1 (Г) в клетках MCF-7, трансфицированных аналогами U25 мяоРНК. Представлено среднее значение изменения уровня мРНК каждого гена относительно референсного гена GAPDH с указанием стандартного отклонения, рассчитанного по данным трех независимых экспериментов

Отсутствие активации системы врожденного иммунного ответа в клетках SK-OV-3 позволило выявить специфические пути функционирования аналогов коротких нкРНК. В частности, было установлено, что под действием аналогов Ubatas и U12 мяоРНК происходит активация экспрессии групп генов, функционально связанных с клеточной миграцией и митозом; под действием аналога U74 мяоРНК наблюдалось подавление экспрессии генов, непосредственно участвующих в сборке мяоРНК-комплексов; а под действием аналога U35a мяоРНК были обнаружены изменения в экспрессии нескольких генов, регулирующих реакцию клеток на окислительный стресс.

Таким образом, введение в структуру аналогов мяоРНК и мяоРНК мономеров с модифицированными основаниями позволило снизить их неспецифические эффекты на клетки человека и выявить функциональные пути их воздействия на клетки человека.

Литература

1. Stepanov G. A. et al. Artificial Analogues of Circulating Box C/D RNAs Induce Strong Innate Immune Response and MicroRNA Activation in Human Adenocarcinoma Cells //Circulating Nucleic Acids in Serum and Plasma—CNAPS IX. Springer International Publishing, 2016. С. 121–125.

**КАРТИРОВАНИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ЭПИТОПОВ
ОСНОВНОГО ИММУНОГЕННОГО БЕЛКА P35
ОРТОПОКСВИРУСОВ ***

**MAPPING OF VIRUS NEUTRALIZING EPITOPES OF THE MAIN
IMMUNOGENIC PROTEIN OF P35 ORTHOPOXVIRUSES**

И.В. Ильичев

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

I.V. Illichev

*Novosibirsk State University,
Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

e-mail: navichev@gmail.com

Аннотация

К роду ортопоксвирусов относятся крупные ДНК-содержащие вирусы, из которых вирус натуральной оспы, вирус оспы обезьян, вирус осповакцины и вирус оспы коровы могут вызывать заболевания у людей. На основе вируса осповакцины создано несколько вариантов вакцин, благодаря которым была уничтожена натуральная оспа, однако эти вакцины не удовлетворяют современным требованиям, поскольку вызывают довольно много побочных эффектов.

Abstract

Orthopoxviruses are large DNA-containing viruses, which includes smallpox virus, monkeypox virus, vaccinia virus and cowpox virus. All of them can cause diseases in humans. Several variants of vaccines have been created on the basis of vaccinia virus, due to which smallpox was destroyed, however these vaccines do not meet modern requirements, since they cause quite a few side effects.

* Работа поддержана грантом РФФ №16-14-00083.

Для разработки противовирусных вакцин нового поколения необходима детальная информация о функциональных эпитопах вирусных белков, узнаваемых вируснейтрализующими и протективными антителами. Целью исследования являлся поиск эпитопов ортопоксвирусного белка р35, отвечающих за связывание с вируснейтрализующими антителами человека.

Для поиска эпитопов использовали технологию фагового дисплея. Для отбора специфических пептидов использовали пептидные библиотеки PhD-12 и PhD-C7C. В библиотеке PhD-12 на каждом бактериофаге в составе белка р3 экспонировался пептид из 12 аминокислотных остатков, а в библиотеке PhD-C7C – пептид из 7 аминокислотных остатков, фланкированных по N- и C-концам остатками цистеина, формирующими ковалентную SS связь. Специфические пептиды отбирали по связыванию с вируснейтрализующим полноразмерным антителом человека, направленным к основному иммунодоминантному ортопоксвирусному белку р35. Анализ последовательностей отобранных уникальных пептидов свидетельствовал о том, что эпитоп, узнаваемый анти-р35 антителом, является прерывистым.

Научный руководитель – д-р. биол. наук, доцент Н.В. Тикунова

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕСТНЫХ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ С ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ ФУРЬЕ

IDENTIFICATION OF AUTOCHTHONOUS *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* STRAINS USING FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY

А.А. Карташев

*Научно-практический Институт садоводства, виноградарства
и пищевых технологий, Кишинев, Республика Молдова*

A.A. Cartasev

*Practical and Scientific Institute of Horticulture and Food Technology,
Chisinau, Republic of Moldova*

e-mail: cartasev@gmail.com

Аннотация

Местные штаммы *Streptococcus thermophilus* были выделены из сырого молока и самоквасных молочных продуктов Молдавии. Предварительно штаммы были идентифицированы на основе морфологических и биохимических тестов. Пять штаммов оценивали с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, которая известна как быстрый метод, требующий минимальной ручной работы и химических веществ. Результаты показали, что ИК спектроскопия с преобразованием Фурье может быть эффективно использована при идентификации штаммов *Streptococcus thermophilus*, выделенных из молока и самоквасных молочных продуктов.

Abstract

Autochthonous *Streptococcus thermophilus* strains were isolated from the raw milk and artisanal dairy products from Moldova. The strains were previously identified on the basis of morphological and biochemical tests. Five strains were evaluated by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, which is known as a rapid method, requiring a minimum of manual work and no chemicals. Results demonstrated that FTIR can be effectively used for identification of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from milk and artisanal dairy products.

До недавнего времени идентификация микроорганизмов основывалась исключительно на традиционных фенотипических и биохимических тестах. Эти характеристики легли в основу формального описания бактерий при идентификации. Классические фенотипические характеристики бактерий включают морфологию, физиологию и биохимические особенности [1]. Термофильные стрептококки, выделенные из молочных продуктов, в большинстве случаев являются штаммами, относящимися к родам *Streptococcus* и *Enterococcus*. В свою очередь, штаммы *Streptococcus thermophilus* являются «полезными» представителями с точки зрения их практического применения при производстве ферментированных молочных продуктов. Многие исследователи отмечают трудности при идентификации бактерий рода *Streptococcus* и *Enterococcus* с использованием только фенотипических методов классификации [2]. Отмечается недостаточность классических фенотипических характеристик, таких как способность расти на среде содержащей эскулин, желчь и ферментация сахаров, устойчивость к антибиотикам и диапазон оптимальных температур роста. В связи с этим, особую актуальность приобретает использование современных молекулярно-биологических подходов для идентификации бактерий, что позволит выбирать лучшие культуры для промышленного применения.

В этом исследовании для идентификации местных штаммов *S. thermophilus* использовалась ИК спектроскопия с преобразованием Фурье, которая известна как быстрый метод, требующий минимальной ручной работы и химических веществ. Данный вид спектроскопии используется не только как метод идентификации бактерий, но также предоставляет информацию о метаболизме бактериальной клетки, фазах развития и устойчивости к антибиотикам [3].

ИК-спектроскопия бактерий специфична для конкретного штамма и проявляет спектральные характеристики клеточных компонентов, таких как жирные кислоты, мембраны и внутриклеточные белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты.

Для идентификации с помощью ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье местные штаммы *S. thermophilus* культивировали на среде M17 с добавлением лактозы. Исследование проводилось в отделении микробиологии, молекулярной биологии и биотехнологии Института исследований пищевых продуктов в Национальном Центре сельского хозяйства и пищевых продуктов, Братислава, Словакия. В качестве контрольного служил штамм *S. thermophilus* A737 из коллекции лаборатории. Образцы выделенных штаммов подвергали спектроскопическому анализу в диапазоне длины волн 4000 см^{-1} и 500 см^{-1} с использованием спектрофотометра, оснащенного модулем HTS-XT, Bruker Optics, Германия. Измерительная пластина с исследуемыми бактериальными суспензиями исследуемых штаммов, представляющие собой пятна непрозрачной пленки внутри кругов, представлена на рис. 1.

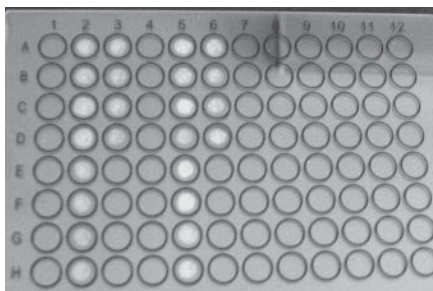


Рис. 1. Пластина Zn-Se с нанесенными и высушенными суспензиями штаммов *S. thermophilus*

Исследование показало, что спектры 6 образцов (5 изолятов *S. thermophilus* и 1 контрольный штамм) сканировались в диапазоне длины волн 4000 и 500 см^{-1} . Каждый образец сканировали 64 раза в два подхода. Пики поглощения наблюдались на длинах волн ~ 3300 , ~ 1600 , ~ 1400 , ~ 1200 , ~ 1100 см^{-1} . ИК спектры исследуемых штаммов *S. thermophilus* показаны на рис. 2

Коэффициент корреляции Пирсона был применен к изученным штаммам по всей области от 4000 см^{-1} до 500 см^{-1} . Максимальная корреляция штаммов достигается с помощью следующих интервалов длины волны: 3000–2800, 1500–1400 и 900–700 см^{-1} .

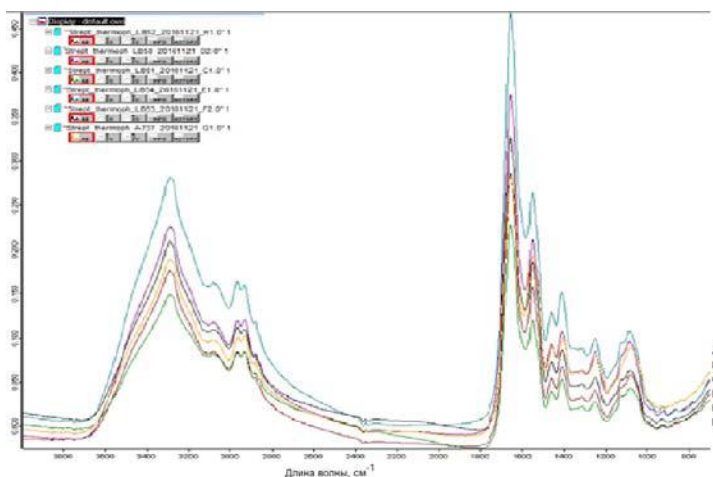


Рис. 2. ИК спектр исследуемых штаммов: А – *S. thermophilus* A73 (контроль), В – *S. thermophilus* CNMN-LB-50, С – *S. thermophilus* CNMN-LB-51, D – *S. thermophilus* CNMN-LB-52, Е – *S. thermophilus* CNMN-LB-53, F – *S. thermophilus* CNMN-LB-54

В результате данного исследования было установлено, что соотношение местных штаммов и контрольного являлось равным 99 %.

Дендрограмма кластерного анализа данных исследуемой пластины приведена на рис. 3.

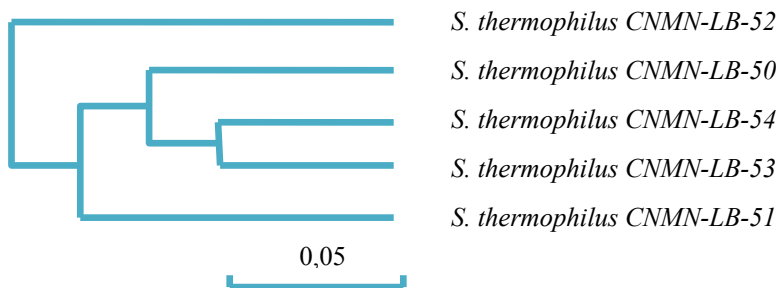


Рис. 3. Дендрограмма исследуемых местных штаммов *S. thermophilus*

Результаты исследований показали, что предложенный метод подходит для идентификации штаммов *S. thermophilus*. Метод сравнительно быстрый и простой, включая 45 мин для подсушивания колоний на пластине при 37°C. Спектроскопическое измерение занимало около 1 мин на образец, а обработка спектров – примерно 6 минут для всей пластины (6 спектров).

Литература

1. Goodfellow M., Minnikin D.E. Introduction to chemosystematics. In: Chemical Methods in Bacterial Systematics. London: Acad. Press, 1985. P. 1–16.
2. Vancanneyt M., Snauwaert C., Cleenwerck I., Baele M., Descheemaeker P., Goossens H., Pot B., Vandamme P., Swings J., Haesebrouck F., Devriese L.A. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhea in piglets. In: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, Vol. 51, N. 2, P. 393–400.
3. Amiali N.M., Mulvey M.R., Berger-Bachi B., Sedman J., Simor A.E., Ismail A.A. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, Vol. 61, P. 95–102.

**САМООГРАНИЧЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫЕ АГЕНТЫ.
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

**SELF-CONSTRAINED COMPLEXES OF NUCLEIC ACIDS
ARE PROMISING GENE-DIRECTED AGENTS.
PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH**

В.А. Кизилова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

V.A. Kizilova

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

Аннотация

Олигонуклеотиды широко применяют для исследования молекулярно-биологических процессов, в генодиагностике и в качестве терапевтических агентов. Для их эффективного применения необходимо осуществлять подбор их нуклеотидных последовательностей и/или вводить в структуры химические модификации. Однако роли вторичной и третичной структуры олигонуклеотидов и их комплексов обычно не уделяется должного внимания. Нами был обнаружен новый тип структур олигонуклеотидов – самоограниченные комплексы, образованные двумя олигонуклеотидами. Проведен их подробный физико-химический анализ. Исследована возможность применения структур с такой пространственной организацией в качестве элемента конструкции искусственной рибонуклеазы, способной эффективно расщеплять РНК.

Abstract

Oligonucleotides are widely used to research molecular biological processes, genodiagnosis and as therapeutic agents. For their effective use it is necessary to select nucleotide sequences and / or introduce chemical modifications into their structures. However, the role of secondary and tertiary structures of oligonucleotides and their complexes is usually underestimated. We developed a new type of oligonucleotide constructions – a self-constrained complex. Detailed physico-chemical analysis of these complexes was carried out. Also it was research of the possibility of using structures with such a dimensional organization as a structural element capable of efficiently cleaving RNA.

Нативные и модифицированные олигонуклеотиды находят применение при исследовании молекулярно-биологических процессов, в генодиагностике и при лечении ряда заболеваний. Благодаря их способности формировать комплексы с комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот можно конструировать структуры со всевозможной пространственной геометрией. Одним из простейших примеров являются линейные полимерные комплексы – конкатамеры. Они могут быть сформированы одним или несколькими типами олигонуклеотидов. Структура конкатамерного комплекса, образованного из двух типов олигонуклеотидов представлена на рис. 1.

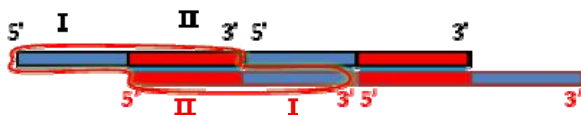


Рис. 1. Схематичный вид контактного комплекса

При изучении данных комплексов было обнаружено, что введение в центральную часть олигонуклеотида гибкого линкера приводит к значительному изменению их размеров, относительно немодифицированных структур. Было предположено, что формируются самоограниченные комплексы. Пример структуры самоограниченного комплекса изображен на рис. 2. Для подтверждения этого была построена термодинамическая модель, которая доказывает возможность формирования таких комплексов. Методами термической денатурации с оптической регистрацией сигнала, задержки в геле и атомно-силовой микроскопии проведено экспериментальное доказательство формирования предложенной структуры.

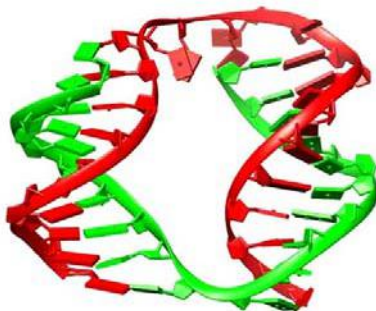


Рис. 2. Самоограниченный комплекс

На следующем этапе работы было показано, что эффективность формирования самоограниченных комплексов зависит от природы и размера линкеров. Возможность существования таких структур была дополнительно подтверждена путем компьютерного моделирования – методом молекулярной динамики. Кроме того, была установлена достаточно высокая конформационная подвижность одноцепочечных линкеров в структуре самоограниченного комплекса. Такая особенность комплексов может быть использована при конструировании искусственных рибонуклеаз.

Мы предположили, что возможно увеличение скорости расщепления фосфодиэфирных связей для одноцепочечного участка РНК, находящегося в самоограниченном комплексе под действием гидролизующих агентов. Для проверки данного предположения было проведено исследование кинетики гидролиза олигорибонуклеотидов в структуре самоограниченного комплекса в растворе имидазола. Было показано увеличение скорости расщепления РНК только по одноцепочечным сайтам в структуре самоограниченного комплекса, относительной одноцепочечного модельного олигонуклеотида. Таким образом, самоограниченные комплексы являются перспективными элементами искусственных рибонуклеаз. Такие конструкции могут найти применение, в составе эффективных терапевтических агентов, в том числе, для нужд персонализированной медицины.

IN SILICO АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРИ ПРОЛАПСЕ ТАЗОВЫХ ОРГАНОВ *

IN SILICO ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PROFILE IN PELVIC ORGAN PROLAPSE

Д.С. Колобков¹, М.Б. Хаджиева^{2,3}

¹ *Институт им. Вейцмана, Реховот, Израиль*

² *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

³ *Национальный научно-практический центр детской гематологии,
онкологии и иммунологии им. Дм. Рогачева, Москва, Россия*

D.S. Kolobkov¹, M.B. Khadzhieva^{2,3}

¹ *Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel*

² *N.I. Vavilov Institute of General Genetics,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

³ *Dm. Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Moscow, Russia*

e-mail: m.had@mail.ru

Аннотация

In silico анализ публично доступных баз данных, связанных с развитием пролапса тазовых органов (ПТО) показал повышенную экспрессию генов, связанных с обновлением тканей, что, возможно, отражает компенсаторные механизмы, направленные на восстановление поврежденной ткани. Неэффективность этого процесса может иметь различное происхождение, в том числе возрастную дерегуляцию экспрессии генов.

Abstract

In silico analysis of publicly available datasets related to pelvic organ prolapse (POP) development revealed the up-regulation of genes related to tissue renewal. Probably it reflects compensatory mechanisms aimed at repair of damaged tissue. Inefficiency of this process may have different origins including age-related deregulation of gene expression.

Pelvic organ prolapse (POP) is the dropping of the pelvic organs caused by the loss of normal support of the vagina. POP is a highly disabling condition common

* The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, Project 15-04-02378.

for a vast number of women worldwide. The proportion of women with pelvic floor disorders is dramatically increasing with age reaching up to 10 % in women aged 20 to 39 years and up to 50 % in women aged 80 years or older. We conducted *in silico* analysis of publicly available gene expression data sets related to POP development to identify new genes and biological processes implicated in POP pathogenesis.

Results of two studies submitted to the repository Gene Expression Omnibus (GEO) were processed with GEO2R – an interactive web tool which exploits Limma R packages from Bioconductor project for comparison of user-defined groups of samples under the same experimental conditions (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>). To find consistent patterns of gene expression profiles in different POP-related datasets, we subjected the whole dataset of Brizzolara stratified by the sort of ligaments (USLs or RLs) and the menopausal status (premenopausal (PrM) or postmenopausal (PM)) to the analysis. Thus, three premenopausal and two postmenopausal sets from GEO studies were analyzed (table 1).

Table 1.

**Characteristics of the POP datasets in the Gene Expression
Omnibus (GEO) database repository**

Dataset	Reference	Tissue	Number of samples	GEO accession no; Platform	Number of DEG ^a with FC ≥ 2.0 and <i>P</i> - value < 0.05 (uncorrected for multiplicity)
PrM Caucasian women (cystocele POP-Q stage ≥ 2), n=12	Citation missing	AVW (POP site) versus precervical AVW (non POP site)	12 women (24 samples)	GSE53868; GPL18142 Agilent-014850 WHGM 4x44K G4112F	74 (↑ 58; ↓16)
PrM POP women, n=5 ^b	Brizzolara et al., 2009	RL	5	GSE12852; GPL2986 ABI Human Genome Survey Microarray Version 2	PrM_RL set 287 (↑ 246; ↓ 41)
		USL	5		PrM_USL set 972 (↑ 949; ↓23)
PrM controls, n=6 ^b		RL	6		
		USL	6		
PM POP women, n=3 ^b		RL	3		PM_RL set 485 (↑ 345; ↓140)
		USL	3		PM_USL set 494 (↑ 263; ↓231)
PM controls, n=3 ^b		RL	3		
		USL	3		
^a ↑ up-regulation; ↓ down-regulation; ^b Mixed ethnicity AVW, anterior vaginal wall; DEG, differently expressed genes; FC, fold change; FDR, false discovery rate; WHGM, whole human genome microarray; PM, postmenopausal; PrM, premenopausal; RL, round ligaments; USL, uterosacral ligaments					

We generated gene sets of differently expressed genes from the GEO2R data by setting the cut-off P-value <0.05 and fold change ≥ 2.0 . Up- and down-regulated gene sets were analyzed separately with the KOBAS 3.0 for Gene Ontology (GO) enrichment analysis. We set the minimum number of genes per category to five, and Benjamini-Hochberg FDR corrected P-value <0.05 . Biological process GO terms for the five sets of over-expressed genes were summarized with the REVIGO. This analysis showed massive enrichment for genes implicated in tissue renewal and regeneration (fig. 1). POP is often accompanied by an altered composition of the extracellular matrix (ECM), but genes related to ECM-structure were not represented among the sets of shared genes according to the GO results. Up-regulated genes were associated with a number of shared terms for all five gene sets. Interestingly, among the most specific GO categories (not more than 500 background genes in the GO database) terms that include the wording ‘positive regulation’ covered biological processes related to: adhesion ($n = 3$), locomotion ($n = 4$), activation ($n = 3$), transport ($n = 2$) as well as cytokine production, MAPK cascade and nervous system development. These mechanistic considerations also provide some evidence that genes that control tissue repair are over-represented among the up-regulated genes in all data sets under study. Inefficiency of this process may have different origins including age-related deregulation of gene expression.

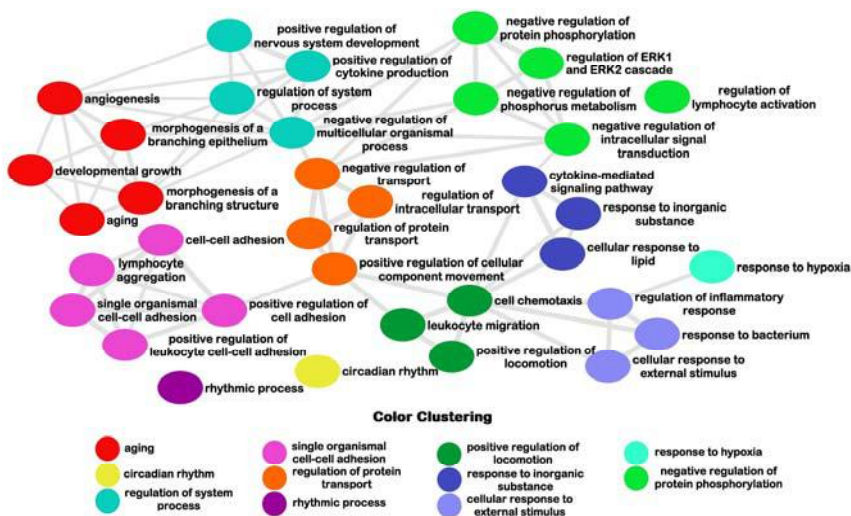


Figure 1. Graph for the results of enrichment analysis for five gene sets up-regulated in POP. More similar nodes are placed closer together. The line width indicates the degree of similarity between GO terms cluster representatives. Clustering by color into super clusters was obtained by using REVIGO TreeMap application

ИЗУЧЕНИЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I ЧЕЛОВЕКА В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКА ПЛАЗМИДНЫХ ДНК

STUDY OF HUMAN APOLIPOPROTEIN A-I AS A CARRIER OF PLASMID DNA.

М.В. Котова, Н.В. Трифонова

НИИ биохимии, Россия

M.V. Kotova, N.V. Trifonova

Research Institute of Biochemistry, Russia

e-mail: zerokiri@mail.ru

Аннотация

В работе представлен материал по исследованию возможности трансфекции изолированных гепатоцитов крыс с помощью рекомбинантного аполипопротеина А-I человека (apoA-I) и его модифицированного варианта (apoAL10). Для трансфекции использовали вектор, экспрессирующий в клетках млекопитающих ген красного флуоресцирующего белка (rfp). В результате исследований показано проникновение ФИТЦ-меченного apoA-I в клетки гепатоцитов, однако белок нативной формы не способствовал переносу плазмиды в клетки. Клетки, инкубированные с модифицированным белком apoAL10, в исследуемых условиях, показали низкие положительные результаты трансфекции.

Abstract

The paper presents a study on the transfection of isolated hepatocytes rats using recombinant human apolipoprotein A-I (apoA-I) and its modified version (apoAL10). For transfection, a vector expressing a red fluorescent protein gene (rfp) in mammalian cells was used. As a result of the studies, the penetration of FITC-labeled apoA-I into hepatocyte cells was shown, but the native protein did not facilitate the transfer of the plasmid into the cells. Cells incubated with the modified apoAL10 protein showed a low part of transfected cells.

В настоящее время широкое внимание исследователей привлекает проблема конструирования переносчиков нуклеиновых кислот (НК), которые безопасно можно было бы использовать в области генотерапии. Одним из направлений в этой области является конструирование рекомбинантных

полипептидов, несущие различные функциональные модули: лиганды для распознавания полипептидом определенного типа клеток; домены конденсирующие нуклеиновые кислоты; пептиды способствующие высвобождению комплексов полипептид:НК из эндосом; сигналы ядерной локализации белков и некоторые другие модули [Canine et. al., 2010; Hatefi et. al., 2017]. В настоящем исследовании мы предположили, что основой для такого полипептида-переносчика мог бы является белковый компонент липопротеинов высокой плотности – апоА-I. Многие клетки организма имеют на мембранах специфические рецепторы к апоА-I [Farve et. al., 1993], особенно высокий уровень наблюдается в клетках печени и опухолевых клетках. Эта особенность апоА-I может быть использована в качестве одной из функций полипептида на его основе при доставке плазмидных ДНК в клетки с помощью рецепторопосредованного переноса. Второй особенностью является его взаимодействие с нуклеиновыми кислотами. Так, ранее в нашем институте было показано, что апоА-I сам по себе и в комплексе с тетрагидрокартизолом связывается с эукариотической ДНК [Gimautdinova et. al., 2007]. На коротких олигонуклеотидах было продемонстрировано, что наибольшее сродство комплекс апоА-I-ТГК имеет к олигонуклеотидам, в состав которых входит (GCC) $_n$ повторы ($n = 3,5$) [Panin et. al., 2011]. Основываясь на этих предпосылках, на специфическом (или слабоспецифическом) взаимодействии апоА-I с ДНК, мы предположили использование апоА-I для переноса плазмидных ДНК (пДНК) в клетки млекопитающих.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности переноса пДНК в гепатоциты крыс с помощью рекомбинантного апоА-I и его модифицированного варианта апоА110.

Материалы и методы. Рекомбинантные белки выделяли из клеток-продуцентов *E.coli* шт. BL21(DE3) с помощью аффинной хроматографии на сорбенте «Ni-NTA Superflow» («Qiagen», США) в денатурирующих условиях, за основу метода использовали протокол фирмы-производителя смолы. Качество белков анализировали в 12 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Леммли. Белки обессоливали общепринятым методом диализа против фосфатно-солевого буфера. Клетки *E.coli* выращивали в стандартных условиях на среде LB, экспрессию целевых генов индуцировали добавлением ИПТГ до 0,1мМ с последующей инкубацией клеток 6-18 часов.

ПЦР проводили с помощью набора реагентов с Taq ДНК-полимеразой фирмы («Евроген», Россия). Состав реакционной смеси использовали согласно инструкции к набору.

Для трансфекции использовали плазмиду pTagRFP (~4,7 т.п.н.) содержащую ген gfp под контролем раннего промотора цитомегаловируса («Евроген», Россия). Плазмиды нарабатывали в клетках *E.coli*, штамм *recA*- «NovaXGF»

(«Novagen», США) в среде LB в присутствии канамицина 30 мкг/мл. Плазмиды выделяли из клеток набором «PlasmidMidiprep» («Евроген», Россия) согласно инструкции. Качество плазмид и анализ фрагментов ДНК (продуктов ПЦР) осуществляли методом электрофореза в 0,8-1,2 % агарозном геле с последующим окрашиванием ДНК бромистым этидием.

Конъюгат апоА-I-ФИТЦ получали путем инкубации белка с ФИТЦ в течение ночи в карбонатном буфере pH 9,5 в соотношении 12,5 мкг ФИТЦ на 1 мг белка. Конъюгат от избытка метки отделяли с помощью гель-фильтрации.

Выделение гепатоцитов проводили методом рециркуляторной ферментативной перфузии с использованием 0,03 % раствора коллагеназы [Панин и др., 2007]. Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом исключения трипанового синего, составляла не менее 90 %. Инкубацию клеток проводили в среде RPMI-1640, содержащей 20 мМ HEPES, 10 % эмбриональную сыворотку коров, 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл гентамицина, 5,6 мМ глюкозы. Инкубацию проводили в CO₂-инкубаторе в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ и 95 % воздуха, при температуре 37°C, используя 24-луночные планшеты («Orange Scientific», США), покрытые коллагеном. Плотность клеток в первичной монослойной культуре составляла ~800 кл/мм².

Инкубацию клеток с комплексом апоА-I-ФИТЦ проводили в течение 1, 3 и 6 часов, концентрация комплекса составляла 5, 10, 20, 40 и 80 мкг/мл. Инкубацию клеток с комплексами апоА-пДНК проводили в течение 6 часов, после чего меняли среду на свежую и инкубировали клетки еще 2е суток. На одну лунку использовали 1,5 мкг пДНК и различное количество апоА – 10, 20 и 40 мкг. По окончании инкубации конъюгата и комплексов клетки снимали с планшетов, отмывали от среды и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра CytoFLEX (Beckman Coulter Inc., США).

Результаты и обсуждение. Ранее в нашей лаборатории был получен продукт рекомбинантного белка апоА-I на основе клеток *E.coli* [Патент РФ № 2573930]. Ген апоА-I был переклонирован в составе модифицированного вектора pET36b(+) в клетках *E. coli* шт. BL21(DE3). На 3'-конце гена содержалась последовательность ДНК, несущая сайт эндонуклеазы рестрикции XhoI и кодирующая восемь гистидиновых а.о. По сайту XhoI, между геном апоА и «гистидиновым хвостом» был встроен дуплекс, кодирующий 10 а.о. лизина (полилизиновый фрагмент). Клоны, несущие вставку полилизина были отобраны методом ПЦР и проанализированы на способность синтезировать модифицированный белок апоА110. Часть положительных клонов была отобра на музей и далее использовалась для наработки биомассы и выделения белка.

В качестве клеточной модели использовали изолированные гепатоциты крыс. Цитофлуорометрический анализ гепатоцитов, проинкубированных с конъюгатом апоА-ФИТЦ показал, что насыщение клеток конъюгатом про-

исходило за 1 час при концентрации конъюгата 20 мкг/мл. Доля клеток поглотивших конъюгат при этом составляла $74,9 \pm 3,3$ % и при дальнейшей инкубации или увеличении концентрации конъюгата существенно не изменялась. Полученные результаты согласуются с ранее полученными данными для клеточных линий асцитной карциномы Эрлиха, НЕК 293Т и RAW264.7, для которых, методом флуоресцентной микроскопии, показано проникновение конъюгата примерно в 1/3 часть клеток.

Инкубация гепатоцитов с комплексами апоА-пДНК показала, что достоверное увеличение доли флуоресцирующих клеток в области флуоресценции RFP произошла только в образцах содержащих апоАЛ10 с концентрацией 40 мкг/мл (избыток белка по отношению к пДНК по массе – 27:1). При этом прирост доли флуоресцирующих клеток относительно контрольных образцов, инкубированных только с пДНК, составил всего ~6 %. Ранее нами в аналогичных экспериментах с нативным апоА-I на клетках асцитной карциномы Эрлиха, НЕК 293Т и RAW264.7 достоверной трансфекции не наблюдалось вовсе [Рябченко и др., 2016]. Вероятной причиной таких результатов могло быть недостаточно специфичное связывание апоА-I нативной формы с пДНК для формирования стабильных комплексов апоА-пДНК.

Для проверки предположения о недостаточно специфическом связывании апоА-I нативной формы с пДНК мы исследовали взаимодействие пДНК с обоими вариантами апоА-I методом ретардации фрагментов ДНК в агарозном геле. Соотношение белок/пДНК по массе варьировалось от 1:0,5 до 1:32, количество пДНК на дорожку составляло 0,5 мкг. В результате анализа мы обнаружили отличия в подвижности исследуемых образцов пДНК только с белком апоАЛ10, причем полная задержка пДНК в карманах геля происходила при соотношении ДНК/белок равном 1:16. Это свидетельствует о том, что введение в структуру апоА-I фрагмента из 10 а.о. лизина увеличило его способность конденсировать на себе пДНК. В литературе описаны эксперименты с пептидами богатыми лизином или гистоновыми фрагментами, размер таких фрагментов составляет от 30 и более а.о. Поэтому, вполне вероятно предположить, что увеличение полилизинового фрагмента до 20-30 а.о. в структуре белка апоАЛ10 усилит его сродство к пДНК и тем самым увеличит его способность к трансфекции клеток.

Вывод. Полученные результаты, в совокупности с полученными ранее данными, говорят о том, что человеческий апоА-I нативной формы не способен переносить пДНК в клетки млекопитающих. Однако при должной модификации – введении полилизинового мотива (либо любого другого фрагмента способного связывать нуклеиновые кислоты), белок может быть использован как основа для конструирования переносчика нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Y-БОКС СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 1 И ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗЫ 1

INTERACTION OF 1Y-BOX BINDING PROTEIN 1 WITH POLY (ADP-RIBOSO) POLYMERASE 1

Т.А. Кургина ^{1,2}, Е.Э. Алемасова ¹, К.Н. Науменко ¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, г. Новосибирск*

² *Новосибирский государственный университет*

Т.А. Kurgina ^{1,2}, Е.Е. Alemasova ¹, К.N. Naumenko ¹

¹ *ICBFM SB RAS*

² *NSU, Russia*

Аннотация

Мы изучили белок-белковые взаимодействия PARP1 и YB-1 in vitro. Для изучения активности поли(АДФ-рибозо)полимеразы 1 использовалась наша новая тест-система. Было показано, что белковый фактор YB-1 активирует PARP1 и способствует синтезу поли(АДФ)рибозы.

Abstract

We studied a protein-protein interaction of PARP1 and YB-1 in vitro. Our new test-system has been used to monitor the poly-ADP-ribosylation activity of PARP1. It was shown that YB-1 activated PARP1 and promotes synthesis of poly-ADP-ribose.

Многофункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) активно изучается в качестве одного из компонентов клеточного ответа на генотоксический стресс. Существует много доказательств того, что YB-1 может участвовать в репарации ДНК. Среди известных фактов, которые подтверждают наличие такой активности выделяют перенос YB-1 из цитоплазмы в ядро в ответ на генотоксический стресс, высокое сродство YB-1 к поврежденной ДНК, а также способность YB-1 функционально взаимодействовать с ключевыми ферментами и белками, участвующими в различных путях репарации ДНК. В некоторых линиях опухолевых клеток

наблюдается повышенная экспрессия YB-1 [1]. Ранее было показано взаимодействие YB-1 с поли(АДФ-рибозо)полимеразой 1 (PARP1), поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 данным ферментом и способность YB-1 связывать поли(АДФ-рибозу) [2].

Поли(АДФ-рибозил)ирование является одним из основных клеточных реакций на повреждение ДНК. PARP1 активируется повреждением ДНК, например, одонитевым разрывом. ДНК при этом выступает в роли кофактора. Используя качестве субстрата NAD⁺, фермент синтезирует поли(АДФ-рибозу), таким образом посттрансляционно модифицируя различные белки. Принято считать, что аутомодификация PARP1 приводит к его диссоциации с ДНК за счёт электростатического отталкивания [3]. Кроме обнаружения повреждений ДНК, PARP1 взаимодействует со многими ферментами, ассоциированными с хроматином и репарацией ДНК. Он участвует в эксцизионной репарации оснований, транскрипции, образовании веретена деления и др. [4]. Такое обилие функций и ведущая роль в репарации одонитевых разрывов делает данный фермент весьма интересной мишенью для создания противораковых препаратов. Терапевтический эффект ингибиторов PARP1 и других компонентов системы репарации основан на предотвращении восстановления ДНК раковых клеток после воздействия другими химиотерапевтическими агентами или ионизирующим излучением. Однако, встречается так же и устойчивость опухолей к ингибиторам PARP1 [5].

Результаты клинического применения ингибиторов PARP1 прошлых поколений могут служить основой для продолжения поиска новых соединений, обладающих большей специфичностью. Важными являются и фундаментальные исследования, вскрывающие механизмы взаимодействия PARP1 с различными компонентами систем, обеспечивающих стабильность генома и их влияние на действие ингибиторов данного фермента.

Наша работа посвящена изучению молекулярного взаимодействия PARP1 и YB-1, а также влиянию YB-1 на действие препарата олапариб – ингибитора PARP1, уже применяемого в клинике.

С помощью разработанной нами тест-системы, основанной на измерении анизотропии флуоресценции, подтверждено ранее показанное физическое взаимодействие PARP1 и YB-1 в присутствии повреждённой ДНК. Варьируя концентрацию YB-1, нами определена KD, отражающая сродство YB-1 к комплексу PARP1-ДНК. Также нами было изучено влияние различных концентраций YB-1 на скорость диссоциации комплекса белков с ДНК при поли(АДФ-рибозил)ировании. Показано, что в присутствии YB-1 происходит преимущественно его поли(АДФ-рибозил)ирование, а аутополи(АДФ-рибозил)ирование PARP1 тормозится. Также нами было изучено

влияние YB-1 на действие олапариба. YB-1 несколько увеличивает IC50 данного ингибитора.

Таким образом, нами показано взаимодействие PARP1 и YB-1 в присутствии ДНК-дуплекса с повреждением. YB-1 способствует увеличению скорости поли(АДФ-рибозил)ирования, при чём в первую очередь PARP1 модифицирует именно YB-1, и только потом – сам себя. Это лежит в основе торможения диссоциации его с ДНК, которое мы наблюдаем при измерении анизотропии флуоресценции. YB-1 снижает эффективность действия олапариба, в его присутствии активность PARP1 наблюдается при тех концентрациях олапариба, при каких свободный PARP1 уже полностью ингибирован. Подобное действие YB-1 может лежать в основе резистентности некоторых опухолей к ингибиторам PARP1, особенно если в них наблюдается повышенная экспрессия YB-1.

Литература

1. Bargou R. et al. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression // *Nat Med.* 1997. No 3(4). P. 447–450.
2. Elizaveta E. Alemasova, Pavel E. Pestryakov et al. Poly(ADP-ribosyl)ation as a new posttranslational modification of YB-1 // *Biochimie.* 2015. No 119. Pp 36–44.
3. Lindahl, T., Satoh, M., Poirier, G., Klungland, A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks // *Trends Biochem Sci.* 1995. No 20. P. 405–411.
4. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair // *Mol Biol (Mosk).* 2016. No 50(4). P. 655–673.
5. Fojo T., Bates S. Mechanisms of resistance to PARP inhibitors--three and counting // *Cancer Discov.* 2013. No 3. P. 20–23.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК СИСТЕМОЙ ЭРН ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ИХ ВЗАИМНЫМ РАСПОЛОЖЕНИЕМ В КЛАСТЕРАХ *

LOCATION OF DNA DAMAGES IN CLUSTERS DEFINES ITS REMOVAL EFFICIENCY BY NER

Н.В. Лукьянчикова, И.О. Петрусёва, О.И. Лаврик

*Институт Химической Биологии и Фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*

N.V. Lukianchikova, I.O. Petrusева, O.I. Lavrik

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

e-mail: lunata9@yandex.ru

Аннотация

Множественные повреждения ДНК в пределах одного или двух витков спирали называют кластерными. Такие повреждения появляются под воздействием агрессивных экзогенных факторов: высоко загрязненная среда обитания, интенсивная комбинированная терапия некоторых болезней.

В этом исследовании мы изучали взаимодействия белков системы ЭРН (экцизионной репарации нуклеотидов) с модельными ДНК, содержащими кластеры, образованные объемными повреждениями, распознаваемыми ЭРН, и ДЕГ, являющимся аналогом АР-сайта. Были проанализированы субстратные свойства модельных ДНК, эффективность распознавания сенсорным белком ХРС и свойства ДНК как аффинных зондов для фотопришивки.

Abstract

Clustered lesions are multiple closely spaced lesions inside one or two turns of DNA helix and can be result of influence of aggressive exogenous factors: highly contaminated environment or intensive combined therapy of certain diseases.

In this research we investigated the interactions of nucleotide excision repair (NER) proteins with the model DNAs bearing clusters formed with NER-recognizable bulky damages and DEG, which is analog of AP-site. The substrate properties of model DNAs, the efficacy of its recognition by XPC and the DNA properties as affinity probes for crosslinking were analyzed.

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 14-24-00038.

Множественные повреждения ДНК, возникшие в пределах одного или двух витков спирали, называют кластерными. Такие повреждения появляются под воздействием сочетания агрессивных экзогенных факторов: высоко загрязненная среда обитания, интенсивная комбинированная терапия некоторых болезней. Кластерные повреждения, являются источником двойных разрывов ДНК и представляют серьезную опасность для клетки. ЭРН (эксцизионная репарация нуклеотидов) в клетках высших эукариот – процесс, с помощью которого из ДНК удаляется широкий спектр повреждений, вызывающих значительные нарушения ее регулярной структуры, такие как УФ-повреждения и объемные химические модификации. В этом исследовании мы изучали взаимодействия белков системы ЭРН с модельными ДНК, содержащими кластеры повреждений, в состав которых входило звено с объемной модификацией в одной цепи и аналог AP-сайта в другой цепи ДНК с различным взаимным расположением.

Целью данной работы было изучение субстратных свойств объемных повреждений в составе ДНК, содержащих кластеры различной структуры и взаимодействия этих модельных ДНК с белками ЭРН.

ДНК (137 н.п.) содержали в одной цепи модельные повреждения pAnt или dC^{FAB}, которые система ЭРН эффективно удаляла как одиночные; варианты комплементарной цепи содержали вставку ДЕГ (диэтиленгликоль), которая вводилась в одну из позиций цепи, расположенной напротив фрагмента, содержащего объемное повреждение. Эффективность удаления повреждения определяли, инкубируя модельные ДНК с белками ядерного экстракта из клеток линии СНО (*Chinese Hamster ovary*). Уровень удаления фрагмента, содержащего объемное повреждение, был резко снижен, если повреждения разделяло менее 4 п.о. В то же время, вставка ДЕГ, сдвинутая на 8-20 п.н. относительно объемного повреждения, не влияла на уровень эксцизии данного повреждения из модельной ДНК. При этом, по результатам проведенного нами равновесного флуоресцентного титрования, сенсор объемных повреждений ХРС обладает наибольшим сродством к ДНК, содержащим кластеры с повреждениями, расположенными на расстоянии меньше 4 п.н.

С использованием в качестве зонда ДНК-дуплекса, содержащего дезоксцитидин с введенной через линкерный фрагмент фторхлор-азидопиридинной группировкой и [³²P]-метку в фотоактивном нуклеотиде, проведены эксперименты по аффинной фотопршивке ХРС и белков экстракта из клеток СНО. Паттерны модификации и интенсивность пришивки белков-мишеней зависели от типа ДНК-зонда и соотношения белок – ДНК в реакционной смеси. Результаты функционального теста, основанного на использовании NAD⁺, указывают на то, что 115-кДа мишень мечения является белком PARP1.

Полученные данные о взаимодействии аналогов поврежденной ДНК с белками комплекса ЭРН позволяют оценить различные варианты судьбы кластеров в составе ДНК клетки млекопитающих, и то, как скорость удаления объемного повреждения в составе кластера связана со структурой и взаимным расположением повреждений.

**РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК
ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 И ЕГО ПРИРОДНОГО
МУТАНТА SCAN1 В КАЧЕСТВЕ ПРОТОТИПОВ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1 (TDP1) AND ITS NATURAL
MUTANT SCAN1 INHIBITORS DEVELOPMENT AS PROTOTYPES
OF DRUGS

Е.М. Мамонтова, А.Л. Захаренко

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

E.M. Mamontova, A.L. Zakharenko

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

e-mail: evgeniya.mm.94@gmail.com

Аннотация

Проведен скрининг 21 соединения – производных кумарина и β -карболина в качестве ингибиторов фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1) и его мутанта SCAN1. Была изучена способность этих соединений ингибировать Tdp1, важную мишень в противораковой терапии. Наиболее эффективные ингибиторы имеют значение IC_{50} , равное 0.1–1 мкМ. Ингибиторы SCAN1 обнаружены впервые. Полученные результаты могут быть использованы для дальнейшей разработки лекарственных препаратов для лечения заболевания SCAN1 и улучшения качества жизни больных SCAN1.

Abstract

In the present study, we performed screening of 21 compounds – derivatives of coumarin and β -carboline as inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) and its mutant SCAN1. The ability of these compounds to inhibit Tdp1, important target for anti-cancer therapy, was studied. The most active derivatives have IC_{50} value of 0.1–1 μ M. SCAN1 inhibitors were found first in the world. They can likely underlie the development of drugs preventing or slowing the progressive cerebellar atrophy to improve quality of life of SCAN1 patients.

Способность раковых клеток распознавать повреждения и инициировать репарацию ДНК является ключевым механизмом терапевтической резистентности к химиотерапии. А потому поиск ингибиторов ферментов репарации ДНК может быть использован в качестве стратегии потенцирования цитотоксичности имеющихся ДНК-повреждающих агентов. Одним из перспективных ферментов-мишеней для создания лекарственных препаратов является тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) [1]. Tdp1 играет важную роль в удалении повреждений ДНК, создаваемых топоизомеразой 1 (Top1), ее ингибитором камптотецином и антираковыми препаратами. Таким образом, терапевтическим эффектом применения ингибиторов Tdp1 в противораковой терапии может быть селективное увеличение активности ингибиторов Top1 в опухолях. В активном центре Tdp1 находится два консервативных каталитических остатка гистидина: нуклеофильный гистидин, атакующий субстрат с формированием ковалентного 3'-фосfogистидинового интермедиата, и гистидин-общее основание/кислота, который разрывает связь Tdp1-ДНК [2].

Природный мутант Tdp1 с заменой His-493 на Arg-493 вызывает тяжелое нейродегенеративное заболевание – синдром спиноцереbellарной атаксии с аксональной невропатией (SCAN1). У пациентов со SCAN1 этот фенотип не проявляется до второй декады жизни и не связан с повышенным риском онкологических заболеваний или иммунодефицитных состояний. Вероятно, патологию вызывает накопление образующихся в ходе реакции ковалентных интермедиатов SCAN1-ДНК [3]. Это позволяет предполагать, что подавление активности SCAN1 улучшит состояние этих пациентов и/или предотвратит прогрессирование болезни.

Данная работа посвящена поиску ингибиторов Tdp1 и SCAN1 для создания лекарственных препаратов на их основе. В качестве потенциальных ингибиторов были использованы соединения – производные кумаринов и β -карболинов. В ходе работы было проверено действие 21 соединения на скорость реакции отщепления тушителя флуоресценции, катализируемой ферментами Tdp1 и SCAN1 с использованием биосенсора олигонуклеотида New7FAM/BNQ. Было обнаружено 6 ингибиторов SCAN1 и 14 ингибиторов Tdp1. Для исследуемых ингибиторов были определены значения IC_{50} . В ходе работы были обнаружены достаточно эффективные ингибиторы Tdp1, имеющие значения $IC_{50} \sim 0.1-1$ мкМ (14 соединений). Впервые обнаружены ингибиторы SCAN1 (6 соединений). Значения IC_{50} , полученные флуоресцентным методом, были подтверждены с помощью метода разделения продуктов реакции в ПААГ.

Ингибирующая способность некоторых веществ как по отношению к Tdp1, так и по отношению к SCAN1 говорит о действии данных ингибиторов на стадию связывания фермента с субстратом, либо на первую стадию ферментативной реакции (образование ковалентного комплекса с ДНК). Тогда как вещества, ингибирующие только Tdp1, влияют на вторую стадию ферментативного катализа, которая отсутствует в случае SCAN1. Действие соединений, которые ингибируют только Tdp1, аналогично действию мутации, вызывающей заболевание SCAN1, т. к. они стабилизируют ковалентный комплекс Tdp1-ДНК. Следовательно, для дальнейшего применения совместно с противораковыми препаратами интересны соединения, ингибирующие оба фермента. Также важно отметить, что, несмотря на способность соединения ингибировать Tdp1, оно может быть непригодно для дальнейших исследований; это определяется типом ингибирования. Так, например, при конкурентном типе ингибирования связывание ингибитора с ферментом происходит в сайте связывания природного субстрата. Это нежелательный вариант, т. к. такие ингибиторы могут связываться со всеми ферментами данного семейства, имеющими схожее строение активного центра, и приводить к побочным эффектам.

Был определен тип ингибирования исследуемых соединений (табл. 1). По результатам функционального теста (воздействия на фермент SCAN1), а также по результатам определения типа ингибирования кинетическими методами были отобраны наиболее перспективные соединения для дальнейших исследований *in vivo* (табл. 1, выделены зеленым цветом).

В целях дальнейшей оценки перспективности разрабатываемых ингибиторов были изучены собственная цитотоксичность соединений, а также их способность влиять на цитотоксический эффект топотекана. Для определения цитотоксичности был использован стандартный MTT-тест, по результатам которого были рассчитаны значения CC_{50} (концентрация соединения, при которой погибает половина клеток). Клеточные работы выполнены на перевиваемых опухолевых клеточных линиях MCF-7, HCT-116, HeLa, а также на неопухолевой клеточной линии HEK-293. Исследованные соединения показали низкую собственную цитотоксичность. Для проверки влияния соединений на цитотоксический эффект топотекана была определена цитотоксичность топотекана в присутствии и в отсутствии ингибитора. Было показано, что некоторые соединения усиливают цитотоксический эффект топотекана.

Таким образом, в ходе работы обнаружены соединения, перспективные для дальнейшей разработки как противораковых препаратов, так и лекарств для лечения нейродегенеративного заболевания SCAN1.

Таблица 1

**Значения IC_{50} и тип ингибирования
наиболее перспективных соединений**

Код соединения	IC_{50} (SCAN1)	IC_{50} (Tdp1)	Тип ингибирования
49689	3.5±2.3 мкМ	(9.9±4.4)*10 ⁻⁸ М	Неконкурентный
51792	13.9±5.6 мкМ	0.25 мкМ	Неконкурентный
52984	6.0±1.5 мкМ	(3.6±1.9)* 10 ⁻⁷ М	Неконкурентный / Бесконкурентный
55562	> 100 мкМ	0.27±0.19 мкМ	Бесконкурентный
51918	25.1±13.7 мкМ	0.5 мкМ	Смешанный
56301	17.6±6.1 мкМ	(9.8±6.0)* 10 ⁻⁷ М	Неконкурентный
56709	14.1±1.9 мкМ	1.3±0.1 мкМ	Неконкурентный
54924	> 100 мкМ	3.1±0.8 мкМ	Бесконкурентный
52144	> 100 мкМ	3.5±0.3 мкМ	Неконкурентный / смешанный
56104	> 100 мкМ	5,6±1,9 мкМ	Неконкурентный/ смешанный

Литература

1. Dexheimer TS., Antony S., Marchand C., Pommier Y. Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase as a Target for Anticancer Therapy // *Anticancer Agents Med Chem*, 2008. Vol. 8. № 4. P. 381–389.
2. Kuznetsov N.A., Lebedeva N.A., Kuznetsova A.A., Rechkunova N.I., Dyrkheeva N.S., Kupryushkin MS¹, Stetsenko D.A., Pyshnyi D.V., Fedorova O.S., Lavrik O.I. Pre-steady state kinetics of DNA binding and abasic site hydrolysis by tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1.// *J Biomol Struct Dyn*. 2016 V. 16. P. 1-14
3. 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. Vol. 24. № 12. P. 2224–2233

**МУЛЬТИПЛИЦИРОВАННЫЕ ГЕНЫ ТРАНСПОРТА
КРЕМНИЕВОЙ КИСЛОТЫ (SIT) У ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ
SYNEDRA ULNA SUBSP. DANIKA***

**MULTIPLICATED GENES OF SILICA TRANSPORTER PROTEIN (SIT)
IN THE DIATOM ALGA *SYNEDRA ULNA* SUBSP. *DANICA***

А.М. Марченков¹, Д.П. Петрова¹, А.А. Морозов¹,
А.А. Бондарь², М.А. Грачев¹

¹ ФГБУН Лимнологический институт СО РАН

² ФГБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

A.M. Marchenkov¹, D.P. Petrova¹, A.A. Morozov¹,
A.A. Bondar², M.A. Grachev¹

¹ *Limnological Institute SB RAS, Russia*

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

e-mail: marchenkov.am@gmail.com

Аннотация

В нашей работе было расшифровано два мультиплицированных *sit*-подобных гена у *Synedra ulna* subsp. *danika* (Kütz.) Skabitsch. Данные гены относятся к новой «группе» генов *sit*, которые кодируют несколько слитых доменов белка SIT, в то время как «обычные» гены *sit* кодируют однодоменные белки. При анализе аминокислотных последовательностей мультиплицированных белков SIT были выявлены консервативные мотивы YQxDxDYL и RDxDID, расположенные на стыке двух доменов SIT – вероятные кандидаты для протеолиза мультиплицированных SIT белков на функциональные SIT.

Abstract

In this work we have sequenced two multiplied *sit*-like genes of *Synedra ulna* subsp. *danica*. They belong to a novel group of *sit* genes that encode several concate-

* Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (0345-2015-0031) и Задание ФАНО России 0345-2014-0006 № гос. рег. 01201353450 «Экспериментальные исследования геномов и протеомов».

nated domains of SIT protein, unlike the single-domain proteins encoded by the full *sit* genes. Analysis of the amino acid sequences allowed to detect two conservative motifs in the interdomain regions; their consensus sequences are YQxDxDYL and RDxDID. These motifs are hypothesised to be the sites of the proteolysis that splits a SIT polyprotein into the functional SITs.

Кремний является вторым по распространённости элементом в земной коре, после кислорода и широко используется различными группами организмов для построения оболочек клеток, придания прочности тканям и скелетам.

Диатомей – это эукариотические одноклеточные водоросли имеют видоспецифичный орнаментированный кремнистый экзоскелет, состоящий из аморфного кремния (SiO_2), который образуется во время биоминерализаций (Mann., 2001). Диатомей являются доминирующей группой фитопланктона в мировом океане, на их долю приходится около 20 % первичной продукции Земли, что сопоставимо с ролью тропических лесов (Field et al., 1998) и они вносят существенный вклад в круговорот кремния, который оценивается в 240 Тмолей в год (Treguer et al., 1995).

Первые гены, кодирующие белки транспорта кремния (silicon transporter – SIT) специфически взаимодействующие с кремневой кислотой обнаружены у диатомовой водоросли *Cylindrotheca fusiformis* (Hildebrand et al., 1997).

«Обычные» гены *sit* кодируют белок, которые имеют один домен SIT состоящий из 10 трансмембранных доменов (ТД), четырёх консервативных мотивов GxQ (Thamatrakoln et al., 2006) и одного CMLD мотива (Grachev et al., 2002).

Гены, кодирующие мультиплицированные белки SIT, впервые обнаруженные у морской пениатной диатомеи *Pseudo-nitzschia multiseries* (Durkin et al., 2012) и пресноводной пениатной диатомеи *S. acus* subsp. *radians* (Marchenkov et al., 2016). Данные гены кодируют белки, которые состоят из нескольких последовательно расположенных слитых доменов SIT. Каждый домен SIT содержит 10 ТД, четыре мотива GxQ и один CMLD (рис. 1, а, б).

Для идентификации мультиплицированных *sit*-подобных генов у *Synedra ulna* subsp. *danika* (Kütz.) Skabitsch использовали данные по структуре последовательности гена *sit-tri* *S. acus* subsp. *radians* KX345281 и вырожденные праймеры, которые были сконструированы на повторяющиеся участки в генах кодирующие мотив CMLDFIN. 5' и 3'-концы генов определяли с помощью 5' и 3'-RACE ПЦР.

Ген *Susit-tri 1* имеет OPC (открытую рамку считывания) протяжённостью 4248 п.н, а OPC гена *Susit-tri 2* 4290 п.н. Гены *Susit-tri 1* и *Susit-tri 2* кодируют по три домена SIT слитых вместе т. е. являются триплетами (рис. 1, а).

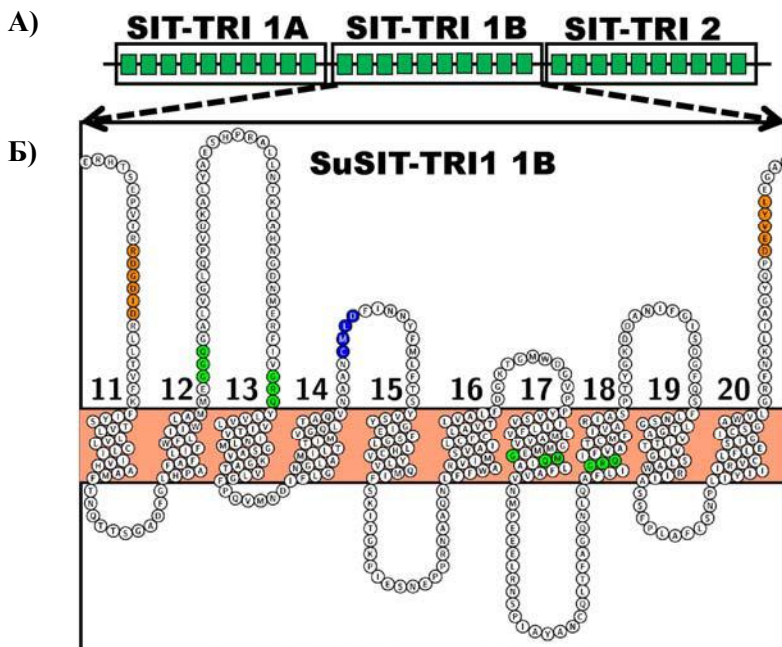


Рис. 1. Схемы расположения белков SIT – TRI в цитоплазматической мембране. А) Общая схема белка SIT-TRI; прямоугольники – домены SIT (SIT-TRI 1A, SIT-TRI 1B, SIT-TRI 2); зеленые блоки – трансмембранные домены (ТД). Б) Домен SIT-TRI-1B *Synedra ulna* subsp. *danica*. Цифрами подписаны ТД. Оранжевые прямоугольники – цитоплазматическая мембрана. Черным прямоугольником выделен домен SuSIT-TRI-1B предсказанный с помощью программы Pfam. Цветами отмечены мотивы: зеленым – GxQ, синим – CMLD, оранжевым – YQxDxDYL и RDxDID. Визуализация построена с помощью программы Protter (Omasits et al., 2014)

В ходе анализа было показано, что ген *Sasit-tri* идентичен гену *Susit-tri-1* на 93,4 %, в то время как *Susit-tri-1* идентичен *Susit-tri-2* на 77,9 %. Таким образом, два гена из одного организма отличаются значительно больше, чем гены между родственными организмами. Причиной, по которой наблюдается данный факт может быть то, что дивергенция двух триплицированных генов у предка данных видов произошла задолго до непосредственной дивергенции самих видов, с последующей утратой одного из триплетов у *S. acus* subsp. *radians*.

В предсказанных аминокислотных последовательностях SuSIT-TRI-1 и SuSIT-TRI-2 два домена идентичны от 98,5 до 96,3 % и имеют отличие лишь в несколько аминокислот, эти домены были названы нами 1A и 1B (рис. 1, а). Идентичность между доменами 1A – 2 и 1B – 2 составляет 71–62,8 % и 70,8–68,7 %, соответственно. Высокий процент идентичности между доменами в триплицированных белках у *S. ulna* subsp. *danika* позволил предположить, что эти домены произошли в результате сравнительно недавней дупликации. Процесс дупликации и образования доменов типа 1A/1B и 2, вероятно, был более ранним событием и они дивергировали гораздо сильнее.

В результате анализа 49 предсказанных аминокислотных последовательностей мультиплицированных белков SIT из 18 видов диатомей и одного вида инфузории *Tiarina fusus* (Ciliophora) (Durkin et al., 2016; Marchenkov et al., 2016) нами были обнаруженные консервативные участки YQxDxDYL, RDxDID, которые расположенные на стыке двух доменов SIT (в конце одного и начале другого домена SIT). Данные мотивы обогащены аспарагиновой кислотой (D). Ранее показаны протеазы специфичные к аспарагиновой кислоте, были идентифицированы в геноме *T. pseudonana* (Bidle and Bender, 2008). Это позволило нам предположить о том, что они могут быть вероятным сайтам протеолиза (рис. 1, б).

Литература

1. Bidle K.D., Bender S.J. // Eukaryotic Cell. 2008. V. 2: 223–236.
2. Durkin C.A., Koester J.A., Bender S.J., Armbrust E.V. // Journal of Phycology. 2016. Vol. 52. P. 716–731.
3. Durkin C.A., Koester J.A., Bender S.J., Armbrust E.V. // J Phycol. 2016. Vol. 52. P. 716–731.
4. Field C.B., Behrenfeld M.J., Randerson J.T., Falkowski P. // Science. 1998. Vol. 281. P. 237–240.
5. Grachev M.A., Denikina N.N., Belikov S.I., Likhoshvai E.V., Usoltseva M.V., Tikhonova I.V., Adelshin R.V., Kler S.A., Scherbakova T.A. // Molecular Biology. 2002. Vol. 36. P. 534–536.
6. Hildebrand M., Volcani B.E., Gassman W., Schroeder J.I. // Nature. 1997. Vol. 385. P. 688–689.
7. Mann S. // University Press, Oxford. 2001. p 198.
8. Marchenkov A.M., Bondar A.A., Petrova D.P., Habudaev K.V., Galachyants Yu.P., Zakharova Yu.R., Volokitina N.A., Grachev M.A. // Dokl Biochem Biophys. 2016. Vol. 471. P. 407–409.
9. Omasits U., Ahrens C.H., Müller S., Wollscheid B. // Bioinformatics. 2014. Vol. 30. P. 884–6. doi: 10.1093/bioinformatics/btt607. Epub 2013 Oct 24.
10. Thametrakoln K., Alverson A.J., Hildebrand M. // Journal of Phycology. 2006. Vol. 42. P. 822–834.
11. Tréguer P., Nelson D.M., Van Bennekom A.J., DeMaster D.J., Leynaert A., Queguiner B. // Science. 1995. Vol. 268. P. 375–379.

**К НОВЫМ МОДЕЛЯМ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ:
ОБОГАЩЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК
ДРЁМЫ ДВУДОМНОЙ MELANDRIUM DIOICUM
(SILENEAE, CARYOPHYLLACEAE) ***

TO THE NEW MODELS IN MOLECULAR BIOLOGY: ENRICHMENT
OF MITOVHONFRIAL DNA FROM MELANDRIUM DIOICUM
(SILENEAE, CARYOPHYLLACEAE)

Ю.В. Михайлова

Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН

Y.V. Mikhaylova

Komarov Botanical Institute RAS

Аннотация

В связи с недавними открытиями необычных свойств митохондриального генома у ряда растений появляется необходимость адаптации методик обогащения мтДНК из дикорастущих немодельных организмов. В работе мы выбрали метод получения митохондрий из дрёмы двудомной на основе дифференциального центрифугирования, а также выделения мтДНК, пригодной для ПЦР и высокопроизводительного секвенирования.

Abstract

Unusual properties of mitochondrial genome in some plants were founded several years ago. Therefore there is a need to adapt methods of mtDNA isolation to a non-model organisms. We apply to the *Melandrium dioicum* species to find out a mitochondrial isolation method based on differential centrifugation and method of isolation of mtDNA applicable to PCR and NGS.

Классическим модельными системами в молекулярной биологии растений являются арабидопсис и сельскохозяйственные культуры. Однако в

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ грант 16-34-01024 (мол_a).

последние годы становится ясно, что для решения многих биологических вопросов необходимы новые модельные системы. Поэтому всё чаще в качестве объектов выступают немодельные организмы [1,2]. Одним из таких перспективных групп являются представители смолёвковых из семейства гвоздичных (*Sileneae*, *Caryophyllaceae*). На видах смолёвки, дрёмы и хлопшушки исследуют такие явления как формирование половых хромосом из аутосом, эпигенетическую регуляцию полового развития, цитоплазматическую мужскую стерильность, молекулярное взаимодействие в парах паразит-хозяин и опылитель-растение [2]. Именно при изучении генома органелл смолёвковых было обнаружено уникальное явление – гигантские мультихромосомные митохондриальные геномы, превышающие в размерах геномы бактерий [3]. Было обнаружено, что в хондриомах этих растений целые митохондриальные хромосомы могут теряться, а рекомбинация по прямым повторам нарушена [4]. Именно расширение спектра исследуемых объектов позволило выявить необычные свойства мтДНК растений [5].

Изучение немодельных растений сопряжено с рядом методологических сложностей, так как большинство методов разработано для модельных видов, и требуется серьёзная адаптация для нового объекта. В связи с этим целью данного исследования было получить из растения дрёма двудомная (*Sileneae*, *Caryophyllaceae*) препараты ДНК обогащённые митохондриальной фракцией, пригодные для высокопроизводительного секвенирования органельного генома. Особый интерес к этому виду связан с необычными свойствами мтДНК у *Sileneae*. Кроме аномально огромного размера для мтДНК смолёвковых была показана высокая скорость мутаций в кодирующих регионах, что крайне нетипично для растительных высоконсервативных митохондриальных генов [6].

Для выполнения задачи были собраны живые растения *Melandrium dioicum* в лесных популяциях Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Отдельно обрабатывались листья и цветки. Определялись следующие параметры методики: соотношение массы растительной ткани и объёма буфера для выделения митохондрий (БВМ), тип и состав БВМ, условия дифференциального центрифугирования, необходимость ферментативной обработки ДНКазой, РНКазой и протеиназой, способ выделения ДНК из осадка митохондрий. Для определения качества полученной мтДНК проводили ПЦР маркерных фрагментов ядерного (ITS), хлоропластного (спейсер *trnL-trnF*) и митохондриального геномов (фрагмент гена *nad*), а также электрофорез в 0,7 % агарозном геле. Количественно ДНК определяли на спектрофотометре Nanodrop 2.

В ходе работы были протестированы два типа БВМ: изоосмотический раствор с сахарозой [7] и раствор высокой ионной силы с хлоридом натрия [8] без аскорбиновой кислоты. Оба БВМ дали удовлетворительные результаты. БВМ с хлоридом натрия удобнее использовать, так как не требуется дополнительный этап центрифугирования полученного осадка митохондрий для перевода на буфер без сахарозы. 2-меркаптоэтанол был заменён на дитиотрейтол в связи с меньшей токсичностью последнего. При увеличении массы гомогенизируемой ткани итоговый выход мтДНК, пересчитанный на грамм ткани, падает. Это может быть связано с потерями на этапе низкоскоростного центрифугирования из-за большого количества клеточного дебриса, который механически уносит часть митохондрий, либо худшей гомогенизацией большой навески. Было выбрано следующее соотношение: 3 г ткани на 40 мл БВМ.

Ферментативная обработка ДНКазой I осадка митохондрий перед выделением ДНК, используемая во многих работах, приводила к значительным потерям ДНК, поэтому в дальнейшем от неё решено было отказаться. РНКазная и протеиназная обработка напротив оказались необходимым этапом получения качественных препаратов. Без обработки РНКазой А конечный препарат был сильно загрязнен РНК, что затрудняло спектрофотометрическую оценку концентрации ДНК. Без обработки протеиназой К значительная часть мтДНК связывалась в комплексы с белками, что делало невозможным использование её для секвенирования.

Для выделения ДНК из осадка митохондрий были использованы наборы «Diamond DNA» (Барнаул, Россия) и «DNeasy Plant Mini Kit» (QIAGEN, Германия) и модифицированный СТАВ-протокол [9]. Самые высокие концентрации ДНК (до 700 нг/мкл) с наименьшими примесями были получены при помощи СТАВ-протокола. При использовании «DNeasy...» концентрации ДНК были значительно меньше (менее 10 нг/мкл, что недостаточно для секвенирования), это может быть объяснено ограниченной ёмкостью ДНК-связывающей колонки. Набор «Diamond DNA» позволял получить препараты с достаточной концентрацией ДНК, но с белковым загрязнением (по отношению A260/280). Во всех полученных образцах успешно амплифицировались маркерные фрагменты генома.

Таким образом нами была получена обогащенная мтДНК из дрёмы двудомной с использованием БВД с высоким содержанием соли и дитиотрейтолом, обработки РНКазой А, протеиназой К и СТАВ-протокола. По качественным и количественным характеристикам полученные пре-

параты можно использовать для молекулярно-биологических приложений, в том числе высокопроизводительного секвенирования.

Автор выражает признательность зав. лаб. экологической физиологии БИН РАН к.б.н. Войцеховской О.В. за предоставленную возможность работать на центрифуге Hettich Rotanta 460R.

Литература

1. Wu C, Lowry D, Cooley A, Wright K, Lee Y, Willis J. *Mimulus* is an emerging model system for the integration of ecological and genomic studies. *Heredity*. 2008; 100(220): 230. DOI: 10.1038/sj.hdy.6801018.
2. Bernasconi G, Antonovics J, Biere A, *et al.* *Silene* as a model system in ecology and evolution. *Heredity* 2009; 103(1): 5–14. DOI: 10.1038/hdy.2009.34.
3. Sloan DB, Alverson AJ, Chuckalovcak JP, *et al.* Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *PLoS biology* 2012; 10(1): e1001241. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001241.
4. Wu Z, Cuthbert JM, Taylor DR, Sloan DB. The massive mitochondrial genome of the angiosperm *Silene noctiflora* is evolving by gain or loss of entire chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015; 112(33): 10185–10191. DOI: 10.1073/pnas.1421397112.
5. Михайлова ЮВ, Терентьева ЛЮ. Гигантские митохондриальные геномы высших растений. *Успехи современной биологии*. 2017; 137(3): 237–246.
6. Sloan DB, Barr CM, Olson MS, Keller SR, Taylor DR. Evolutionary rate variation at multiple levels of biological organization in plant mitochondrial DNA. *Molecular biology and evolution*. 2008; 25(2): 243–6. DOI: 10.1093/molbev/msm266.
7. Triboush SO, Danilenko NG, Davydenko OG. A Method for Isolation of Chloroplast DNA and Mitochondrial DNA from Sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1998; 16(2): 183–183. DOI: 10.1023/A:1007487806583.
8. Беленикин, М. С. Криницына АА, Логачева МД, Купцов СВ, Сперанская АС. Секвенирование *de novo* и сравнительный анализ хлоропластных геномов четырех видов рода *Allium*, произрастающих в условиях высокогорий или на равнинах. *Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии* 2016; 15: 107–111.
9. Doyle J. DNA Protocols for Plants. In *Molecular Techniques in Taxonomy*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1991; 283–293. DOI: 10.1007/978-3-642-83962-7_18.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДЕЛЕЦИИ
с.2235_2249del В ГЕНЕ EGFR В ПЛАЗМЕ БОЛЬНЫХ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО**

**OPTIMIZATION OF PCR CONDITIONS FOR DETECTING
с.2235_2249del IN EGFR GENE IN THE PLASMA OF PATIENTS
WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER**

З.М. Миракбарова ¹, Ш.У. Турдикулова ², Б.Р. Адилов ³

¹ *Национальный Университет Узбекистана
имени Мирзо Улугбека, Узбекистан*

² *Учебно-экспериментальный центр высоких технологий,
Ташкент, Узбекистан*

³ *Институт Биоорганической химии имени А.С. Садыкова при Академии
Наук Республики Узбекистан*

Z.M. Mirakbarova ¹, Sh.U. Turdikulova ², B.R. Adilov ³

¹ *National University of Uzbekistan named after Mirzo Ulugbek*

² *Educational-Experimental Center for High Technologies*

³ *Institute of Bioorganic Chemistry named after A.S. Sadikov, under the Acad-
emy of Sciences of the Republic of Uzbekistan*

e-mail: zebyniso@gmail.com

Аннотация

Одним из наиболее распространенных мутаций, обуславливающих развитие рака легких является делеция (с.2235_2249del) участка гена EGFR длиной 15 п.н. При выборе методов терапии больных с данной мутацией, применяют направленные методы подавления экспрессии гена EGFR. Целью данного исследования явилась оптимизация условий проведения ПЦР для выявления делеции у больных с немелкоклеточным раком легкого для последующего применения таргетной терапии.

Abstract

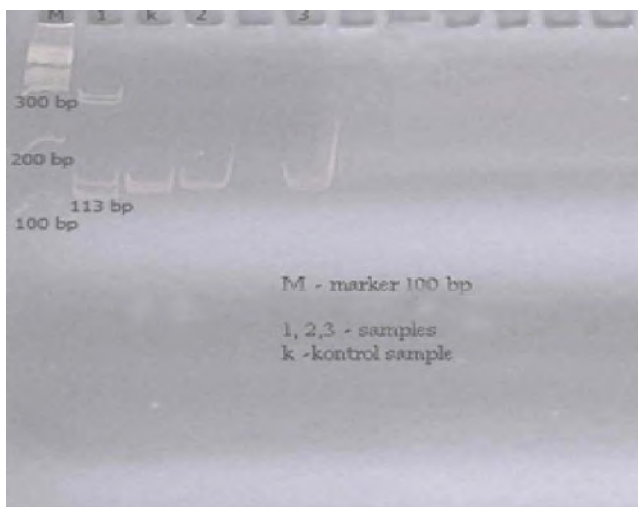
One of the most common mutations, leading to development of lung cancer is considered to be с.2235_2249deletion of 15 bp region in EGFR gene. In treating these patients direct methods of suppressing the EGFR gene expression are used. Aim of this

research is to optimize conditions of PCR reaction for detecting deletion in patients with non small cell lung cancer for further implementation of targeted therapy.

Lung cancer is one of the main factors, leading to cancer-related mortality around the world. One of its most common types is considered to be non-small cell lung cancer (NSCLC), which accounts from 80 to 90 % of lung cancer cases in different populations. Recently it was discovered that patients of NSCLC with activating mutations of EGFR gene responded in spectacular form to treatment with tyrosine kinase(TK) inhibitors of EGFR ¹, therefore study of the mutational state of EGFR became a matter of urgent necessity in patients with lung cancer ². In 40 % to 80 % of patients with NSCLC, EGFR is overexpressed or carries mutations in the TK domain located in exons 18-21 ³. The most common of these mutations include the 15 bp exon 19 deletion (c.2235_2249del) and the exon 21 point mutation (c.2573T>G) that together comprise 85–90 % of all reported EGFR mutations found in NSCLC. EGFR (also known as ErbB-1/HER1) belongs to the ErbB family of receptor tyrosine kinases (RTK), which also includes distinct receptors: ErbB-2 (neu, HER2), ErbB-3 (HER3) and ErbB-4 (HER4). EGFR has an extracellular ligand-binding domain (621 amino acids), a transmembrane anchoring region (23 amino acids), and an intracellular tyrosine kinase (542 amino acids) ⁴. Improper activation of EGFR TK results in increased malignant cell survival, proliferation, invasion and metastasis ².

The aim of our research was to optimize the conditions of fluorescent polymerase chain reaction (PCR) assay, for detecting c.2235_2249del deletion in EGFR gene of NSCLC patients from Uzbek population

As a material we used FFPE plasma samples, obtained from 3 NSCLC donor patients. The PCR-amplification was carried out, using allele specific primer. The PCR-products were then distinguished in 8 % acrylamide gel electrophoresis and detected in MULTI-DOC Imaging Transilluminator M-20, UVP, 115V. All three amplified PCR products were shown to consist of 113 bp region.



Consistent with other reports (Sanders, Heather R. et al. 2008), we found c.2235_2249deletion in EGFR gene of patients, suffering from lung cancer. The incidence of this mutation suggests, that the c.2235_2249deletion in EGFR gene may play an important role in lung carcinogenesis in Uzbek population.

Although chemotherapy is appropriate for many patients with lung cancer, there is a sense that the use of traditional chemotherapeutic agents has reached a therapeutic plateau. The results of our study show the importance of further elaboration of this method as a potentially important factor in determining therapeutic strategies.

References

1. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA N Engl J Med. 2004 May 20; 350(21):2129–39.
2. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Nat Rev Cancer. 2007;7:169–181.
3. Structure and function of the epidermal growth factor (EGF/ErbB) family of receptors DJ Leahy (2004)Advances in Protein Chemistry 68:1–27.
4. Review Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. Mendelsohn J, Baselga J J Clin Oncol. 2003 Jul 15; 21(14):2787–99.
5. A sensitive and specific method for detection of mutations in Exons 19 and 21 of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in the plasma of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. Sanders, Heather R.; Qu, Kevin Z.; Sferruzza, Anthony D.; Strom, Charles M.; Bender, Richard A. Cancer Therapy . 2008;6(2):793–804.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СОМАТО-СТВОЛОВОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ *

EXPRESSION OF SOMATIC-STEM TRANSITION GENES IN BREAST TUMOR DURING NEOADJUVANT TREATMENT

Ю.А. Небова ¹, М.К. Ибрагимова ^{1,2}, М.М. Цыганов ², Н.В. Литвяков ^{1,2}

¹ *Национальный исследовательский Томский
государственный университет*

² *Научно-исследовательский институт онкологии «Томский национальный
исследовательский медицинский центр» Российской академии наук*

J.A. Nebova ¹, M.K. Ibragimova ^{1,2}, M.M. Tsyganov ², N.V. Litviakov ^{1,2}

¹ *National research Tomsk State University*

² *Cancer Research Institute is a subdivision of the «Tomsk National
Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences»*

e-mail: Julia.nebova@gmail.com

Аннотация

При исследовании опухоли молочной железы 62 больных до лечения и после не-оадьювантной химиотерапии показана гиперэкспрессия в резидуальной опухоли 14/16 генов сомато-стволового перехода (*5p15.33 TERT*; *7q32.1 SMO*; *8q11.21 SNAIL2*; *9p21.2 MOB3B*; *9q22.33 TGFBR1*; *10p11.23 BMI1*; *10p13 VIM*; *13q12.2 FLT3*; *16p11.2 LAT*; *18q21.1 SMAD2*; *19p13.3 LMNB2*; *19p13.13 KLF1* и *19q13.2 TGF-β1*) у больных с развившимися впоследствии метастазами. Это подтверждает нашу гипотезу о важной роли активации способности к сомато-стволовому переходу для метастазирования опухолей, которая происходит под действием не-оадьювантной химиотерапии. Установлен новый прогностический фактор, который позволяет прогнозировать возникновение гематогенных метастазов чувствительностью 69 %, специфичностью 94 % и диагностической точностью 82 %.

* Работа поддержана грантом РНФ 17-15-01203.

Abstract

In a study of breast cancer of 62 patients before and after neoadjuvant chemotherapy, overexpression in the residual tumor of 14/16 genes of the somato-stem transition was shown (5p15.33 *TERT*; 7q32.1 *SMO*; 8q11.21 *SNAI2*; 9p21.2 *MOB3B*; 9q22.33 *TGFBR1*; 10p11.23 *BM1*; 10p13 *VIM*; 13q12.2 *FLT3*; 16p11.2 *LAT*; 18q21.1 *SMAD2*; 19p13.3 *LMNB2*; 19p13.13 *KLF1* and 19q13.2 *TGF- β 1*) in patients with metastases that subsequently developed. This confirms our hypothesis about the important role of activation of the ability to somato-stem transition for tumor metastasis, which occurs under the influence of neoadjuvant chemotherapy. A new prognostic factor has been established, which makes it possible to predict the occurrence of hematogenous metastases with a sensitivity of 69 %, a specificity of 94 %, and a diagnostic accuracy of 82 %.

В 2015–2016 гг. при исследовании клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе предоперационной (неоадьювантной) химиотерапии (проект РФФИ №15-04-03091 в лаборатории онковирусологии НИИ онкологии Томского НИМЦ впервые было показано, появление в процессе НАХТ или сохранение в резидуальной опухоли после химиотерапии опухолевых клонов, несущих амплификации в 2-х и более регионах: 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q, сопряжено со 100 % гематогенным метастазированием. Иначе говоря был выявлен абсолютный прогностический фактор для рака молочной железы, который позволяет со 100 % эффективностью прогнозировать исход заболевания. [Litviakov N., et al., 2015, Litviakov N., et al., 2016, Ибрагимова М.К. и др., 2017]. На основании этих данных нами была высказана рабочая гипотеза о том, что клоны, несущие амплификации в 5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p локусах являются потенциальными метастатическими клонами. Их появление в опухоли в процессе канцерогенеза или под действием химиотерапии является одним из последних этапов опухолевой эволюции и может происходить даже при малых размерах (T1-T2) опухоли. Аннотирование генного состава амплифицированных регионов (5p, 6p, 7q, 8q, 13q, 9p, 9q, 10p, 10q21.1, 16p, 18chr, 19p) показало, что в каждом из них находятся гены, которые связывают с индукцией стволовых клеток, в частности: *OCT3* – 6p21.31, *KLF4* – 9q31, *MYC* – 8q24, которые составляют коктейль Яманаки [Takahashi K., et al., 2006] и многие другие (5p15.33 *TERT*; 7q32.1 *SMO*; 8q11.21 *SNAI2*; 9p21.2 *MOB3B*; 9q22.33 *TGFBR1*; 10p11.23 *BM1*; 10p13 *VIM*; 13q12.2 *FLT3*; 16p11.2 *LAT*; 18q21.1 *SMAD2*; 19p13.3 *LMNB2*; 19p13.13 *KLF1* и 19q13.2 *TGF- β 1*). Мы полагаем, что в процессе клональной эволюции опухоли соматическими (не стволовыми) опухолевыми клетками, благодаря

гиперэкспрессии (например, за счет амплификации локусов) этих генов, приобретает способность к обратному переходу (транзиции) в опухолевые стволовые клетки (мы назвали его сомато-стволовой переход). Предполагается, что только такие опухолевые клетки могут образовывать метастазы.

Целью данного исследования являлось изучение связи экспрессии в опухоли молочной железы при проведении неоадьювантной химиотерапии генов сомато-стволового перехода, локализованных в 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p, 19q с клинико-морфологическими параметрами заболевания и метастазированием. Производилась оценка связи экспрессии данных генов с эффективностью неоадьювантной химиотерапии и гематогенным метастазированием опухоли молочной железы.

Материалы и методы

Анализ производился на основе материала 62 больных РМЖ с морфологически верифицированным диагнозом и клинической стадией IА – IIIВ (T₁₋₄N₀₋₃M₀) люминального В, триждынегативного и HER2-позитивного молекулярных подтипов, в возрасте 26-68 лет (средний возраст 47,43 ± 0,78 лет). Больные получали 2-4 курса неоадьювантной химиотерапии (НАХТ) по схемам FAC (5-fluorouracil 600 мг/м², adriamycin 50 мг/м² и cyclophosphamide 600 мг/м² один раз в 3 недели), CAХ (cyclophosphamide 100 мг/м² внутримышечно, adriamycin 30 мг/м² внутривенно, xeloda 1200 мг/м² перорально), монотерапия таксотером (100 мг/м² часовая инфузия в день), CMX (cyclophosphamide 100 мг/м² внутримышечно, methotrexate 30 мг/м² внутривенно, xeloda 1200 мг/м² перорально). Через 3-5 недель после НАХТ проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или другого вида органосохранной операции, затем больным проводили 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. У 14/62 (22 %) больных в течение 5-ти лет после лечения развились гематогенные метастазы.

РНК из биопсии опухоли до лечения и операционного материала после НАХТ выделяли при помощи наборов RNeasy mini kit plus (Qiagen, Germany). Экспрессию генов сомато-стволового перехода оценивали при помощи метода обратнo-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan. Амплификации локусов 5p, 6p, 7q, 8q, 9p, 9q, 10p, 13q, 16p, 18q, 19p,

19q определяли при помощи микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA).

Результаты

Было установлено влияние на уровень экспрессии отдельных генов сомато-стволового перехода в опухоли до лечения и после НАХТ возраста больных, рецепторного статуса и молекулярного подтипа (экспрессия гена *OCT3* в резидуальной опухоли больных моложе 45 лет статистически значимо выше, чем у пациенток старше 45 лет ($p = 0,0189$)). В опухоли рецептор (ER и PR) позитивных больных до лечения и после НАХТ значимо выше экспрессия генов теломеразы и *TGFB1* по сравнению с ER- и PR-негативными больными. У больных люминальным В РМЖ уровень экспрессии генов *MYC* и *TGFB1* в биопсии выше, чем у больных HER2-позитивным РМЖ.

До проведения лечения количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода в опухоли у больных без метастазов и с метастазами не различается и составляет 6/16 (38 %) и 7/16 (44 %), соответственно. После проведения НАХТ в остаточной резидуальной опухоли у больных без метастазов количество гиперэкспрессированных генов сомато-стволового перехода остается прежним, в то время как у больных с развившимися впоследствии метастазами после проведения НАХТ количество гиперэкспрессированных генов увеличивается в два раза и составляет 14/16 (88 %). Это подтверждает нашу гипотезу о важной роли активации способности к сомато-стволовому переходу для метастазирования опухолей, причем в данном случае активация происходит под действием неоадьювантной химиотерапии.

Была установлена предиктивная значимость экспрессии генов *TGFBRI* и *KLF1* в опухоли молочной железы до лечения. При уровне экспрессии гена *TGFBRI* меньше 0,8 плохой ответ на НАХТ отмечается только у 6 из 39 (15 %) больных, в то время при экспрессии больше 0,8 у 13 из 21 (62 %) больных отмечается отсутствие ответа на НАХТ (по критерию Фишера $p = 0,0004$). Если в опухоли до лечения ген *KLF1* не экспрессируется, то 13/24 (54 %) не отвечают на химиотерапию, при ненулевой экспрессии гена *KLF1* только 6/36 (17 %) не отвечают на НАХТ (по критерию Фишера $p = 0,004$).

Одновременная гиперэкспрессия генов *OCT3*, *LAT* и *LNMB2* в остаточной резидуальной опухоли после НАХТ сопряжена с неблагоприятным исходом. При гиперэкспрессии в остаточной резидуальной опухоли трех генов *OCT3*, *LAT* и *LMNB2* у 11/16 больных (69 %) развиваются гематогенные метастазы. При гипозэкспрессии хотя бы одного из этих генов 5-ти

летняя безметастатическая выживаемость составляет 94 % (34/36) (по критерию Фишера $p = 0,000004$). Чувствительность прогноза метастазирования составляет 69 % специфичность 94 % диагностическая точность 82 %.

Таким образом, показана гиперэкспрессия в резидуальной опухоли после НАХТ генов сомато-стволового перехода у больных с развившимися впоследствии метастазами. Предиктивная значимость экспрессии генов *KLF1* и *TGFBR1* в опухоли до лечения позволяет прогнозировать непосредственную эффективность НАХТ. Установлен новый прогностический фактор, который позволяет прогнозировать возникновение гематогенных метастазов чувствительностью 69 %, специфичностью 94 % и диагностической точностью 82 %).

Литература

1. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В. Естественная и химиоиндуцированная клональная эволюция опухоли.// Биохимия. 2017. Т. 82. № 4. С. 572–586.
2. Litviakov N., Ibragimova M., Tsyganov M., Kazantseva P., Slonimskaya E., Cherdyntseva N. P77: Clonal evolution of breast tumor during neoadjuvant chemotherapy and metastasis // European Journal of Cancer Supplements. 2015. Vol. 13, N 1. P. 34.
3. Litviakov N., Cherdyntseva N., Ibragimova M., Tsyganov M., Doroshenko A., Kazantseva P., Kzhyshkowska J., Slonimskaya E. The clonal evolution of a breast tumor during neoadjuvant chemotherapy and metastasis // Annals of Oncology. 2016. Vol. 27, N suppl 6. P. 299P.
4. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. V. 126, N 4. P. 663–676.

**ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА
ВО ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ:
ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПОЛОВЫХ КЛЕТКИ ГАМЕТ
ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

**PERSONALIZED MEDICINE
IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES: DIFFERENTIATION
OF GERM CELLS AND GAMETES FROM STEM CELLS**

М.В. Полякова

*Центр системной биомедицины и биотехнологии
Сколкового института науки и технологий, Россия*

M.V. Poliakova

*Center for Data-Intensive Biomedicine and Biotechnology
of Skolkovo Institute of Science and Technology, Russia*

e-mail: marusiapoliakova@gmail.com

Аннотация

Бесплодие является серьезной и во многом неизлечимой болезнью, вызванной разрушением и уменьшением половых клеток. Оно затрагивает 10–15 % пар, и на мужской фактор приходится половина случаев. Получение мужских половых клеток, особенно функциональных сперматид, очень важно для лечения мужского бесплодия. Стволовые клетки обладают потенциалом дифференцироваться в различные функциональные типы клеток, и их открытие дало толчок к развитию в области регенеративной медицины. В настоящее время достигнут значительный прогресс в генерации мужских половых клеток, включая сперматогонии, сперматоциты и сперматиды, из различных типов стволовых клеток. Такие половые клетки также могут быть использованы в исследовании патологии мужского бесплодия. Цель нашего исследования – изучение терапевтического потенциала стволовых клеток для восстановления мужской фертильности.

Abstract

Infertility is a major and largely incurable disease caused by disruption and loss of germ cells. It affects 10–15 % of couples, and male factor accounts for half of the cases. To obtain human male germ cells ‘especially functional spermatids’ is essential for treat-

ing male infertility. Stem cells have the potential to differentiate into different functional cell types, and their discovery has given rise to the field of regenerative medicine. Currently, much progress has been made on generating male germ cells, including spermatogonia, spermatocytes, and spermatids, from various types of stem cells. These germ cells can also be used in investigation of the pathology of male infertility. We focus here on the therapeutic potential of stem cells for rejuvenating male fertility.

Infertility, caused by the absence or disruption of germ cells, is becoming a significant human health concern because it affects 10–15 % couples, and male factors account for about 50 % of causes, which has become a severely social issue. A potentially useful treatment to restore non-genetically caused male infertility is the stem cell transplantation using primordial germ cells (PGCs) or advanced germ cells.

In clinical practice, ensuring the patient's health is the primary need. Reproductive stem cell loss begets from a variety of conditions including chemo- and radiotherapy, genetic and congenital conditions such as Klinefelter' syndrome (KS; 47,XXY) and cryptorchidism. Stem cell research is of great importance in treating male infertility.

Assisted reproduction techniques with semen cryopreserved before the onset of gonadotoxic treatment has shown good fertility outcome. Although semen cryopreservation is the first action for preserving male fertility, this cannot help out prepubertal boys. Yet, these boys do have spermatogonial stem cells (SSCs) that able to produce sperm at the start of puberty, which allows them to safeguard their fertility through testicular cell suspensions or testicular tissue cryopreservation. This would be especially important for survivors of childhood cancer. Autologous SSCs transplantation, testicular tissue grafting to the testis or to a heterotopic area and *in vitro* spermatogenesis have opened new possibilities to restore fertility in humans. These fertility restoration techniques have been successfully applied in several animal models and are considered to be very promising for future clinical applications.

However, these techniques are still at a research stage and their efficiency depends on the amount of SSCs available for fertility restoration. To this date, no clinical parameters are available to efficiently diagnose and detect patients who might benefit from these techniques. Retrieval of SSCs in prepubertal boys should therefore still be viewed as experimental model.

Studies on mouse models as well as human gene mutation have suggested a correlation between genetic causes (e.g. chromosomal aberrations and single gene mutation) and male infertility. For male infertility with a normal genetic background, stem cell therapy to generate male gametes may also represent a promising treatment strategy. Stem cells, by definition, have the potentials of

both self-renewal and differentiation. Recent studies have reported that induced pluripotent stem cells (iPSCs) from mice and humans can differentiate into PGCs. But, whether iPSCs are capable of producing late male germ cells is not known.

Currently there are three major stem cell sources for generating male differentiated germ cells: the embryonic stem cells (ESCs), iPSCs, and SSCs. Compared with human ESCs, iPSCs have some advantages: i) there is no ethical issue for using human iPSCs; ii) the source for obtaining human iPSCs is more abundant; and iii) male gametes derived from patients' own iPSCs have genetic information; iiiii) mature cells derived from patient iPSCs can be used for patient-specific cell therapy without immune rejection. iPSCs are pluripotent and therefore have the ability to differentiate into various types of cells that could be used for cell transplantation and tissue engineering in reproductive and regenerative medicine.

Few studies have examined the ability of iPSCs from mice and human to differentiate into late-stage male germ cells. Earlier Kobayashi's group reported that adult-derived iPSCs can be generated from the testicular tissue of a patient with KS by the retroviral transduction of several pluripotent genes, including OCT4, SOX2, KLF4, and C-MYC. They researched the potential of these cells for multipotency by differentiation into the three germ layers *in vivo* [1].

Known that retinoic acid (RA) stimulates downstream gene expression in male testes after birth and that RA could be used to induce ESCs or iPSCs to differentiate into PGCs. Furthermore, RA, an active derivative of vitamin A, regulates the timing of meiotic initiation in mice. The correct timing of sexual development has been demonstrated to require the early embryoid body (EB) expression of Stra-8, stimulated by RA (Stra8 is a target gene of RA, and the transcription of Stra8 is significantly upregulated by retinoic acid (RA) in iPSC cell-derived EBs), and male-specific development proceeds this event.

Recently, there are many studies demonstrating the feasibility of obtaining PGCs from the iPSC cells via reprogramming of fetal and adult somatic cells. Rodent iPSCs are used for appraising the generation of male germ cells derived from iPSC cells. It has recently been shown that mouse iPSC cells could differentiate into SSCs and late-stage male germ cells [2] with an approach of EB formation and RA induction or through RA or testosterone induction of EB formation [3].

These studies demonstrate that iPSC cells have the potential to differentiate into the later stages of male germ cells. The derivation of male germ cells from iPSC cells constitutes both a desirable model for reproductive geneticists, and a potential method for treating patients with infertility due to germ cell defects.

These investigations thus will provide a platform for exploring the molecular mechanisms underlying spermatogenesis and raises the possibility of

using male germ cells derived from patient -derived iPS cells. The Sertoli cell-only syndrome patients without male germ cells might father own biological children using their iPS cells-derived male gametes. Also the ability to generate germ cells without introducing retroviral vectors would be a remarkable advantage for using iPSCs in regenerative therapies to treat male infertility.

References

1. Shimizu T., Shiohara M., Tai T. et al. Derivation of integration-free iPSCs from a Klinefelter syndrome patient // *Reprod Med Biol* (2016) 15:35–43.
2. Zhu Y., Hu H.L., Li P. et al. Generation of male germ cells from induced pluripotent stem cells (iPS cells): an in vitro and in vivo study // *Asian Journal of Andrology* (2012) 14:574–579.
3. Li P., Hu H., Yang S. et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells in vitro through embryoid body formation and retinoic acid or testosterone induction // *BioMed Research International* (2013) 608728.

**НОВЫЙ ПОДХОД К ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ
ПОВЕРХНОСТИ КНИ-ТРАНЗИСТОРА
ДЛЯ БЕЗМЕТОЧНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ КОРОТКИХ РНК**

**NEW APPROACH OF SOI-FET SURFACE FUNCTIONALIZATION
FOR LABEL-FREE DETECTION OF SHORT RNA**

А.В. Порываева¹, М.С. Купрюшкин¹,
Э.Г. Зайцева³, Е.В. Дмитриенко^{1, 2}

¹*Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет*

³*Институт физики полупроводников СО РАН, Новосибирск*

A.V. Poryvaeva¹, M.S. Kuprushkin¹,
E.G. Zayceva³, E.V. Dmitrienko^{1, 2}

¹*ICBFM SB RAS, Russia*

²*NSU, Russia*

³*ISP SB RAS, Russia*

Аннотация

Предложен новый тип модификации поверхности SOI-FET датчиков с ультратонкой модифицированной поверхностью и незаряженными зондами для специфического обнаружения коротких РНК-мишеней. Для модификации были использованы глицидоксипропилтриметоксисилан и карбонилдиимидазол.

Abstract

A new type of surface modification of SOI-FET sensors with ultrathin sensor-probe transition layer and uncharged probes for highly specific detection of short RNA analyte was suggested. 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilane and 1,1'-carbonyldiimidazole were used for modification of silicon surface.

Регуляторные РНК, такие как микроРНК и длинные некодирующие РНК играют важную роль в транскрипционной и пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов. Они участвуют в различных жизненно важных процессах, а именно в делении клеток, миграции и апоптозе, и поэто-

му имеют отношение к прогрессированию заболеваний человека, включая рак. Циркулирующие микроРНК, мРНК и lncRNA перспективные молекулярные маркеры для диагностики рака.

В настоящее время диагностика раковых заболеваний стремится к максимально раннему обнаружению, когда лечение будет ещё не таким дорогостоящим и губительным для организма, но при этом максимально эффективным. Детекция маркерных микроРНК отвечает данным требованиям, но чувствительность выявления должна достигать уровня 10^{-13} – 10^{-16} М. Биосенсорная система, работа которой обеспечивается кремниевым полевым транзистором, способна обеспечить такую чувствительность в режиме реального времени без дополнительного мечения биологического образца (например, крови) [1].

Сенсорный элемент такого типа реагирует на изменение заряда на его поверхности. Поэтому для обеспечения большей эффективности следует избавиться от зарядов, не относящихся к анализируемым РНК-мишеням. К этой категории относятся как специфические зонды иммобилизованные на поверхности сенсора, так и ионы, необходимые для гибридизации мишени с зондом. Минимизировать количество заряженных элементов позволяет использование незаряженных производных нуклеиновых кислот в качестве специфических зондов. Такие модифицированных олигонуклеотиды, помимо того что сами не имеют заряда, способны к гибридизации с мишенью в условиях минимальной ионной силы раствора.

Целью настоящей работы была разработка удобного подхода модификации поверхности КНИ-датчиков (Кремний На Изоляторе) для специфичного обнаружения коротких РНК, обеспечивающего минимизацию расстояния между КНИ-датчиком и РНК-мишенью, и суммарного заряда в системе.

В качестве анализируемых мишеней использовались 23-звенные последовательности флуоресцентно-меченных РНК, ассоциированные с немелкоклеточным раком легкого, а в качестве зондов для иммобилизации – соответствующие олигомеры, несущие первичную аминогруппу, на основе незаряженных пептидил-нуклеиновых кислот (ПНК) и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных аналогах (ФГО) [2].

В ходе работы была сконструирована модельная система, имитирующая поверхность кремниевой проволоки, на которой исследовали эффективность иммобилизации зондов на поверхность и гибридизации с флуоресцентно-мечеными РНК-мишенями из раствора. В качестве модификатора поверхности для дальнейшего присоединения к ней зондов использовали ГОПТС (глицидоксипропилтриметоксисилан) и КДИ (карбонилдимидазол). Оптимизированы условия иммобилизации незаряженных зондов на по-

верхность и дальнейшей гибридизации с флуоресцентно-меченной РНК из раствора, которые удовлетворяют основным требованиям для использования при разработке КНИ-биосенсора.

Для выявления РНК-мишеней с использованием КНИ-биосенсора проводили функционализацию поверхности кремниевой проволоки с помощью предложенного подхода. Регистрировали вольт-амперные характеристики кремниевых сенсоров разных типов: модифицированный ГОПТС, КДИ и содержащий комплементарные зонды ПНК и ФГО попарно соответственно. Показано, что оба типа сенсоров демонстрируют чувствительность до 1 пМ, однако ГОПТС-модифицированный сенсор демонстрирует больший отклик даже в случае контрольной (пустой) проволоки. При этом КДИ-модифицированный сенсор позволяет выявить до 10^{-15} М РНК [3].

Литература

1. Zhang G.-J. et al. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009. Vol. 24. P. 2504–2508.
2. Kupryushkin M. S., Pyshnyi D. V., Stetsenko D. A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues. *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6, N.4 (23). P. 116–118.
3. Dmitriyenko et al. Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte. *Nanomedicine*. 2016. Vol. 11, N. 16, P. 2073–2082.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОМБИНАТОРНЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЦР В ОБРАТНОЙ ЭМУЛЬСИИ*

ENZYMATIC METHOD FOR PRODUCTION OF MODIFIED COMBINATORIAL DNA LIBRARIES WITH PCR IN AN INVERSE EMULSION

К.С. Ромашова, С.А. Лапа, А.В. Чудинов

*ФГБУН Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

K.S. Romashova, S.A. Lapa, A.V. Chudinov

EIMB RAS, Russia

e-mail: lapa@biochip.ru

Аннотация

Разработана и оптимизирована разновидность метода эмульсионной ПЦР для получения модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек. С использованием разработанного подхода получен вариант ДНК-библиотеки, содержащий фрагмент 3-метилбутановой кислоты, введенный по азотистому основанию дезоксиуридина. Проведено разделение цепей полученной в результате эмульсионной ПЦР двухцепочечной комбинаторной библиотеки. Результирующая одноцепочечная модифицированная ДНК-библиотека полностью совместима с методологией SELEX и может использоваться для отбора высокоспецифичных модифицированных аптамеров к широкому спектру молекулярных мишеней.

Abstract

The variant of the method of emulsion PCR for the production of modified combinatorial DNA libraries has been designed and optimized. Using the developed approach, the resulting variant of DNA library containing fragment of 3-methylbutanoic acid at the deoxyuridine nitrogenous base have been obtained. Separation of the chains of resulting double-stranded combinatorial library has been performed. The resulting

* Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.576.21.0096, уникальный идентификатор проекта RFMEFI57617X0096).

single-stranded modified DNA library is fully compatible with the SELEX methodology and can be used for the selection of high-affinity modified aptamers to a wide range of molecular targets.

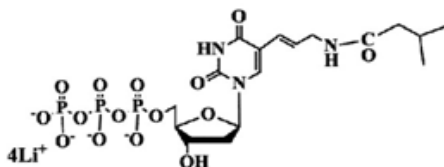
Модифицированные нуклеиновые кислоты находят применение не только в роли молекулярных гибридизационных зондов, но и в качестве биосенсоров, аптамеров, модифицированных аптамеров (сомамеров), аптазимов и даже индивидуальных терапевтических агентов. Аптамеры представляют собой одноцепочечные РНК- или ДНК-олигонуклеотиды, обладающие аффинным сродством к определенным молекулярным мишеням, что позволяет рассматривать их в качестве функциональных аналогов моноклональных антител. Введение химических модификаций в аптамеры (сомамеры) позволяет существенно расширить спектр физико-химических взаимодействий с молекулярными мишенями, повысить аффинность и селективность. Ферментативные методы наиболее перспективны как для создания модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек, используемых для получения сомамеров, так и в самой процедуре отбора SELEX. Процедура SELEX представляет собой последовательный направленный отбор методом итерационного обогащения из комбинаторных библиотек в сторону обогащения высокоспецифичными к молекулярной мишени олигонуклеотидами, и в конечном итоге – для отбора индивидуального сомамера. Такие библиотеки содержат «вырожденный» участок с перебором всех четырех азотистых оснований, включая модифицированный нуклеотид и концевые праймерные участки. Процесс введения в олигонуклеотидные последовательности модифицированных азотистых оснований осложняется трудностью совмещения с используемыми в процедуре SELEX методами амплификации ДНК. Наиболее распространенным способом решения данной проблемы является замена ПЦР на менее требовательную к применяемым субстратам (модифицированным трифосфатам дезоксинуклеозидов) реакцию удлинения праймера (primer extension, PEX). Однако, особенностью реакции PEX являются низкая производительность и небольшой выход конечного продукта.

Задача разработки воспроизводимого, эффективного и технологичного способа получения модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек для создания высокоспецифичных сомамеров является крайне важной.

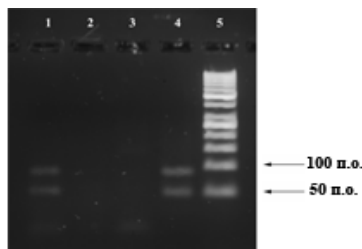
Для решения задачи нами разработан вариант высокопроизводительного метода ПЦР в обратной эмульсии, оптимизированный для получения модифицированных комбинаторных ДНК-библиотек и адаптированный к приме-

нению в методологии SELEX. ПЦР в обратной эмульсии представляет собой разновидность амплификации в изолированных реакционных компартментах, микропузырьках водной фазы в минеральном масле, стабилизированных специальным набором поверхностно-активных веществ (ПАВ). Сконструированы праймеры, фланкирующие вырожденный фрагмент библиотеки длиной 40 нуклеотидов, осуществлена оптимизация состава ПАВ, минерального масла и температурно-временного цикла ПЦР. Химически синтезирована немодифицированная олигонуклеотидная матрица для ферментативного получения модифицированной ДНК-библиотеки.

С использованием синтезированной вырожденной матрицы и ряда модифицированных по пиримидиновому основанию трифосфатов дезоксиуридина в качестве субстратов, была оценена эффективность получения модифицированных ДНК методом эмульсионной ПЦР. По результатам проведенной оценки субстратной эффективности было выбрано производное 5-аминоаллил-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфата, содержащее на пиримидиновом основании фрагмент 3-метилбутановой кислоты (см. рис. 1, а), которое затем использовали в эмульсионной ПЦР для препаративного получения модифицированной комбинаторной ДНК-библиотеки.



а)



б)

Рис. 1. а) Структурная формула модифицированного трифосфата дезоксиуридина для получения модифицированной комбинаторной ДНК-библиотеки; описание приведено в тексте; б) Проверка разделения цепей модифицированной комбинаторной ДНК-библиотеки с помощью реакции удлинения праймера; описание приведено в тексте

Для разделения цепей полученной двухцепочечной комбинаторной ДНК-библиотеки использовали биотинилированный праймер и магнитные наночастицы с иммобилизованным на поверхности стрептавидином. Был получен одноцепочечный вариант модифицированной ДНК-библиотеки, необходимый для проведения раундов селекции модифицированных аптамеров (сомамеров).

Для проверки эффективности разделения цепей была использована реакция PEX. В каждую из пробирок вместо двух праймеров был добавлен только один: либо прямой, либо обратный праймер. Электрофоретический анализ показал, что в случае использования биотинилированной цепи в роли матрицы и при добавлении прямого праймера присутствуют продукты удлинения праймера в одноцепочечном и двухцепочечном вариантах (см. рис. 1, б, лунка электрофорезного геля № 1). Такая же ситуация наблюдается и в случае небитинилированной цепи, но с обратным праймером (лунка № 4). В вариантах с применением биотинилированной цепи с обратным праймером (лунка № 2) и небитинилированной цепи с прямым праймером (лунка № 3) продукты удлинений праймера отсутствуют. Для определения длин продуктов использовали маркер длин ДНК «GeneRuler 50bp», электрофорез проводили в 5 % агарозном геле. Полученные результаты доказывают успешное разделение цепей и получение биотинилированной и небитинилированной цепей комбинаторной ДНК-библиотеки.

Показано, что амплификация модифицированных ДНК-библиотек посредством разработанного варианта эмульсионной ПЦР резко снижает конкурентную амплификацию и образование побочных продуктов, обеспечивает вовлечение в процесс всего набора последовательностей вырожденной комбинаторной библиотеки в том числе при полной замене природного трифосфата дезокситимидина на модифицированные. по пиримидиновому основанию трифосфаты дезоксиуридина, выгодно отличаясь этим от классических разновидностей ПЦР в одном общем объеме. Полученная одноцепочечная модифицированная ДНК-библиотека полностью совместима с методологией отбора аптамеров SELEX и может применяться для получения высокоспецифичных модифицированных аптамеров (соматеров). Разработанный вариант метода эмульсионной ПЦР, адаптированный для получения модифицированных ДНК с последующим разделением цепей на магнитных частицах, обладает универсальностью и пригоден для получения широкого спектра модифицированных ДНК-библиотек, а также для проведения полного цикла селекции модифицированных аптамеров с использованием методологии SELEX.

ЭКЗОСОМЫ И ДРУГИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ БЕЛКОВЫЕ КОМПЛЕКСЫ МОЛОКА: СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ *

EXOSOMES AND OTHER MILK EXTRACELLULAR PROTEIN COMPLEXES: STRUCTURE AND BIOLOGICAL ROLE

С.Е. Седых ^{1,2}, Л.В. Пурвинш ¹, С.Е. Соболева ², Г.А. Невинский ^{1,2}

¹ *Новосибирский государственный университет*

² *Институт химической биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения РАН*

S.E. Sedykh ^{1,2}, L.V. Purvinsh ¹, S.E. Soboleva ², G.A. Nevinsky ^{1,2},

¹ *Novosibirsk State University*

² *SB RAS ICBFM, Russia*

e-mail: sedyh@niboch.nsc.ru

Аннотация

Белки и белковые комплексы составляют лишь 1 % сухой массы молока, но при этом обеспечивают большую часть его биологических функций. Экзосомы и другие белковые комплексы молока имеют клеточное происхождение, в связи с чем изучение белкового и нуклеинового состава этих структур позволяет с новой стороны проанализировать процессы, происходящие в клетках, секретирующих молоко. Всестороннее изучение внеклеточных белковых структур молока имеет несомненный фундаментальный и практический потенциал.

Abstract

Proteins and protein complexes constitute only 1 % of the milk dry weight, but provide the most of biological functions. Exosomes and other protein complexes of milk have a cellular origin, and therefore the study of protein and nucleic composition of these structures allows to analyze the processes taking place in cells secreting milk. A comprehensive study of extracellular milk protein structures has a significant fundamental and practical potential.

* Работа поддержана грантом РФФИ 16-04-00609.

Большинство биологических процессов осуществляются белковыми комплексами, в которых индивидуальные белки взаимодействуют друг с другом, а также с другими факторами. В молоке человека нами обнаружен стабильный высокомолекулярный белковый комплекс, в зависимости от донора молока, составляющий до 25 % сухой массы белков. Основными белками комплекса являются лактоферрин и альфа-лактальбумин. Показано, что препараты стабильного белкового комплекса эффективно гидролизуют ДНК и олигосахариды, а также содержат нуклеиновые кислоты.

Известно, что клетки выделяют во внеклеточное пространство везикулы, содержащие компоненты цитозоля. Особым типом везикул являются экзосомы, имеющие диаметр 40-100 нм и секретирующиеся в результате слияния мультивезикулярных эндосом с плазматической мембраной клетки. Показано, что наряду с белками плазматической мембраны, экзосомы также содержат другие белки, а также нуклеиновые кислоты (в том числе, микроРНК) и в связи с этим играют важную роль в межклеточной коммуникации.

В экзосомах молока обнаружены сотни уникальных микроРНК. Другие микроРНК, обнаруженные в экзосомах молока, содержатся в повышенных в сравнении с другими источниками концентрациях. В сравнении с экзогенными микроРНК, эндогенные микроРНК более стабильны в жестких условиях. Согласно некоторым данным, микроРНК экзосом молока человека могут направленно переноситься из организма матери в организм ребенка и играть важную роль в развитии иммунной системы новорожденного.

Изучение белков и нуклеиновых кислот внеклеточных белковых комплексов молока является важной фундаментальной задачей. Сравнение белкового и нуклеинового состава экзосом, а также стабильного белкового комплекса молока, позволит установить роль этих структур в осуществлении биологических функций молока.

**ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ
NK КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ
БЕЛКА VAV1 ***

**ANTITUMOR ACTIVITY OF HUMAN NK CELLS
WITH VAV1 OVEREXPRESSION**

A.C. Смагина

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

A.S. Smagina

*Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS
Novosibirsk State University*

Аннотация

Аутологичные и аллогенные NK клетки представляют собой многообещающий инструмент иммунотерапии опухолей. Дальнейшего усиления их эффекторных функций можно достичь с помощью генетической модификации. В данной работе исследовалось влияние сверхэкспрессии белка Vav1 на противоопухолевую активность линейных NK-клеток человека. Обнаружено, что полученная линия клеток YT с сверхэкспрессией Vav1 превосходит по цитотоксичности в отношении раковых линий YT клетки дикого типа и линию KHYG-1. Более того, модифицированные YT клетки, культивированные в среде без добавления цитокинов, не уступали в цитотоксичности первичным NK-клеткам, стимулированными IL-2 и IL-15. Таким образом, NK клетки с сверхэкспрессией Vav1 могут стать генетической основой для создания противоопухолевых клеточных продуктов.

Abstract

Autologous and allogeneic NK cells are promising tools for cancer immunotherapy. Genome modification could further enhance their effector functions. In this research, we study how Vav1 overexpression modulate antitumor activity of human linear NK cells. YT cell line overexpressing Vav1 was shown to be superior in cyto-

* Исследование было поддержано грантом РФФИ № 17-04-02044.

toxicity compared to the wild-type YT cells and the KHYG-1 cell line. Moreover, the modified YT cells cultivated in cytokine-free medium possess cytotoxicity comparable to primary NK cells, that were prior stimulated by IL-2 and IL-15. Thus, Vav1 overexpressing NK cell lines could become novel genetic background for anti-tumor cellular products.

Онкологические заболевания представляют собой значимую медико-социальную проблему, в связи с чем продолжается активный поиск новых терапевтических возможностей. В последнее время всё больше внимания уделяется клеточной иммунотерапии, одним из направлений которой является использование первичных или линейных генетически модифицированных НК-клеток человека.

НК-клетки играют критическую роль в раннем контроле над вирусными инфекциями и иммунном надзоре над опухолями [1]. Отличительной особенностью НК клеток является то, что они не требуют предварительной сенсibilизации. Активация естественных киллеров определяется балансом сигналов от активирующих и ингибирующих рецепторов на их поверхности. Злокачественные клетки со сниженной плотностью молекул МНС I, либо с повышенным уровнем стресс-маркеров могут запускать эффекторные функции НК-клеток (цитотоксичность, продукция цитокинов и пролиферация) [2]. Некоторые опухолевые клетки, однако, недостаточно активируют НК-лимфоциты и ускользают от иммунного надзора. Из-за этого терапия первичными или линейными НК клетками показывает ограниченную эффективность для многих видов рака. Генетическая модификация НК-клеток, смещающая баланс сигналов в сторону активации, способна нивелировать этот эффект и обеспечить достаточную противоопухолевую активность киллерных клеток.

Как вариант такой модификации нами была рассмотрена overэкспрессия белка Vav1. Этот белок является важным сигнальным элементом и в норме экспрессируется в клетках гематopoэтической системы [3]. Данный белок участвует в передаче сигнала от активирующих рецепторов НК клеток (в частности NKG2D), регулируя их цитотоксическую активность [4, 5]. Кроме того, Vav1 необходим для аккумуляции актина и поляризации центра, организующего микротрубочки в месте контакта НК-клетка мишень [5].

В ходе работы была получена лентивирусная конструкция, кодирующая кДНК гена Vav1 под сильным конститутивным промотором EF1a. С применением этой конструкции были наработаны псевдовиральные частицы и получена линия клеток YT с overэкспрессией кДНК

гена Vav1 (далее YT-Vav1). Методом иммуноблота показан существенно более высокий уровень экспрессии Vav1 в полученной линии по сравнению с родительскими клетками YT и другими НК-клеточными линиями (KNYG-1, NK92).

Методом RTCA было обнаружено, что YT-Vav1 клетки проявляют значительно более выраженную цитотоксичность в отношении раковых линий в опыте *in vitro* по сравнению с YT клетками дикого типа и линией KNYG-1. Более того, модифицированные YT клетки в среде без добавления цитокинов не уступали в цитотоксичности первичным НК-клеткам, стимулированным IL-2 и IL-15.

Таким образом, усиление активационных сигналов за счёт гиперэкспрессии сигнальных белков (в частности Vav1) в результате генной модификации повышает противоопухолевую активность линейных НК-клеток. Использование химерных антигенных рецепторов при этом, вероятно, позволит решить проблему специфичности. В перспективе гиперэкспрессия Vav1 может быть использована для создания эффективных клеточных терапевтических продуктов.

Литература

1. Wood S.M., Ljunggren H.G., Bryceson Y.T. Insights into NK cell biology from human genetics and disease associations / *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. 68. P. 3479–3493.
2. Morvan M.G., Lanier L.L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks / *Nature Reviews Cancer*. 2016. 16. P. 7–19.
3. Katzav S. Vav1: A Dr. Jekyll and Mr. Hyde protein – good for the hematopoietic system, bad for cancer / *Oncotarget*. 2015. 6(30). P. 28731–28742.
4. Cella M., Fujikawa K., Tassi I. et al. Differential requirements for Vav proteins in DAP10- and ITAM-mediated NK cell cytotoxicity / *J. Exp. Med.* 2004. 200. P. 817–823.
5. Graham D.B., Cella M., Giurisato E., et al. Vav1 controls DAP10-mediated natural cytotoxicity by regulating actin and microtubule dynamics / *J Immunol*. 2006. 177. P. 2349–2355.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ АКТИВАЦИИ ФАКТОРА,
ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ, В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА НА АНГИОГЕННЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ***

THE STUDYING OF ACTIVATION EFFECTS OF HYPOXIA INDUCIBLE
FACTOR IN HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS ON THE POTENTIAL
OF ENDOTHELIAL ANGIOGENIC DERIVATIVES

А.М. Смирнова^{1, 2, 4}, М.К. Живень^{2, 3, 4}, И.С. Захарова^{2, 3, 4}
А.И. Шевченко^{1, 2, 3, 4}, Е.А. Елисафенко^{2, 3, 4}, С.М. Закиян^{1, 2, 3, 4}

¹ Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет

² Федеральный исследовательский центр
«Институт цитологии и генетики СО РАН»

³ ФГБНУ «Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН»

⁴ ФГБУ «Национальный Медицинский Исследовательский Центр
им акад. Мешалкина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Аннотация

Данная работа посвящена влиянию активации HIF-альфа в нормоксических условиях, реализованной с использованием системы CRISPR/Cas9, в плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) человека на ангиогенные свойства их эндотелиальных производных. Разрабатывается модель взаимосвязи активации HIF-альфа в ПСК человека на реализацию ангиогенных сигнальных каскадов в их дифференцированных эндотелиальных производных

Abstract

This work is devoted to the influence of HIF-alpha activation in normoxic conditions, realized by using CRISPR/Cas9 system, in human pluripotent stem cells (PSC) on angiogenic properties of their endothelial derivatives. The model of the connection between HIF-alpha activation and the realization of angiogenic signal cascades in their differentiated endothelial derivatives is being developed.

* Работа поддержана грантом РНФ № 17-75-10047.

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) – ДНК-связывающий транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в регуляции ангиогенеза. В настоящее время модуляция HIF-пути является перспективной терапевтической стратегией для управления различными заболеваниями.

Данная работа посвящена влиянию активации HIF-альфа в нормоксических условиях, реализованной с использованием системы CRISPR/Cas9, в плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) человека на ангиогенные свойства их эндотелиальных производных. Разрабатывается модель взаимосвязи активации HIF-альфа в ПСК человека на реализацию ангиогенных сигнальных каскадов в их дифференцированных эндотелиальных производных. Исследуются эффекты повышения экспрессии и стабилизации субъединиц HIF-1альфа и HIF-2альфа в эндотелиальных производных ПСК человека. Подобраны последовательности направляющих РНК для сайленсинга *INT6/eIF3* – ингибитора HIF-2 α – с использованием системы CRISPR/Cas9. Последовательности направляющих РНК, предназначенные для ингибирования *INT6/eIF3* и сверхэкспрессии HIF-2альфа, заклонированы в векторы и доставлены в ИПСК человека линии iMA-1L с помощью нуклеофекции. Методом проточной цитометрии произведен сортинг GFP-позитивных колоний, содержащих целевую встройку, проведены раунды субклонирования. Получены генетически-модифицированные ПСК человека с делецией размером в 200 п.н., включающей точку старта транскрипции и начало первого экзона *INT6/eIF3*.

Результаты данного исследования внесут значительный вклад в понимание фундаментальных молекулярных механизмов HIF-зависимого ангиогенеза, расширят представления о сигнальных каскадах, запускаемых при целевой активации HIF, что необходимо для разработки эффективных стратегий модуляции экспрессии HIF для терапевтического ангиогенеза и лечения ряда онкологических заболеваний.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИН-1-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ВИРУСА ОСПЫ КОРОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

STUDY OF THE PRODUCTION OF RECOMBINANT INTERLEUKIN-1-BINDING PROTEIN OF COWPOX VIRUS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

М.Е. Старчевская, Т.С. Непомнящих, С.Н. Якубицкий,
О.С. Таранов, Д.В. Антонеч, С.Н. Щелкунов

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

M.E. Starchevskaya, T.S. Nepomnyaschih, S.N. Yakubizkiy,
O.S. Taranov, D.V. Antonec, S.N. Shchelkunov

SRC VB «Vector», Russia

Аннотация

Интерлейкин-1-связывающий белок вируса оспы коров ингибирует основной медиатор воспаления – интерлейкин-1 β . В результате проделанной работы получена рекомбинантная плазмида экспрессии pcDNA/IL-1-BP, кодирующая интерлейкин-1-связывающий белок. Синтез мРНК, кодирующей целевой белок показан с помощью ОТ-ПЦР как в системе *in vitro* на линии клеток CV-1, трансфицированных рекомбинантной плазмидой pcDNA/IL-1-BP, так и *in vivo* – в образцах мышечной ткани морских свинок, получивших инъекцию рекомбинантной ДНК.

Abstract

Interleukin-1-binding protein of cowpox virus inhibits the main mediator of inflammation – interleukin-1 β . As a result of the work done, a recombinant expression plasmid pcDNA/IL-1-BP, encoding the interleukin-1-binding protein, was obtained. Synthesis of mRNA encoding the target protein is shown by RT-PCR *in vitro* in the CV-1 cell transfected with the recombinant plasmid pcDNA/IL-1-BP and *in vivo* in muscle tissue of guinea pig injected with recombinant DNA.

Аутоиммунные заболевания относятся к числу наиболее тяжелых заболеваний человека. В патогенезе большинства из них наблюдается гиперпродукция интерлейкина-1 β (IL-1 β), который индуцирует образование

других агентов, приводящих к системному воспалению. Одним из подходов к терапии данных заболеваний является ингибирование IL-1 β . Представители рода *Ortopoxvirus* кодируют ряд белков – иммуномодуляторов. В частности анализ нуклеотидных последовательностей их геномов выявил открытые рамки трансляции белков, имеющих высокую гомологию с клеточным рецептором IL-1 β . Для вируса оспы коров выявлена открытая рамка трансляции IL-1-связывающего белка (IL-1-BP), который ингибирует IL-1 β . Таким образом, исследование данного вирусного белка может привести к созданию нового анти-IL-1 β препарата.

Одним из способов обеспечения долговременной экспрессии гена является иммунизация ДНК-вакцинами. Цель настоящего исследования – изучение продукции IL-1-BP вируса оспы коров в составе плазмиды pcDNA/IL-1-BP *in vitro* и *in vivo*.

Был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей, кодируемых геном IL-1-BP, 22 штаммов вируса оспы коров, степень гомологии последовательностей составила около 95 %. В качестве референса использовали ген B14R вируса оспы коров (штамм GRI-90). На наиболее близкой к B14R структуре рецептора IL-1 идентифицировали аминокислотные остатки, участвующие в связывании IL-1 β . Показана высокая консервативность исследуемых белков, функционально значимые районы IL-1-BP практически не содержат аминокислотных замен, относительно B14R.

Была получена рекомбинантная плазида pcDNA/IL-1-BP для экспрессии IL-1-BP *in vitro* и *in vivo*. Одним из подходов к изучению экспрессии белка является оценка продукции мРНК и визуализация биологических эффектов белкового продукта. Для оптимизации условий использовали ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), заключенный в тот же вектор экспрессии pcDNA, что и ген IL-1-BP. Клетки CV-1 трансфецировали плазидами pcDNA/IL-1-BP или pcDNA/GFP. Визуализировали продукцию GFP методом флуоресцентной микроскопии. Выделяли мРНК и проводили ОТ-ПЦР для качественной оценки продукции мРНК *in vitro*. Проводили инъекцию морским свинкам рекомбинантных плазмид pcDNA/IL-1-BP или pcDNA/GFP. Визуализировали продукцию GFP методом флуоресцентной микроскопии. Выделяли мРНК и проводили ОТ-ПЦР для качественной оценки продукции мРНК *in vivo*. В результате исследования показана продукция *in vitro* и *in vivo* рекомбинантного IL-1-BP вируса оспы коров штамма GRI-90.

В дальнейшем полученная рекомбинантная плазида pcDNA/IL-1-BP может стать основой для создания терапевтической ДНК-вакцины

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ
РЕКОМБИНАНТНОГО ДОМЕНА ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО
БЕЛКА TRF2, НЕОБХОДИМОГО ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТЕЛОМЕР С ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНОЙ**

**DEVELOPMENT OF METHODOLOGY FOR PRODUCTION
AND DECONTAMINATION OF RECOMBINANT DOMAIN OF TRF2
TELOMER-BINDING PROTEIN NECESSARY FOR STUDY
OF MECHANISMS OF TELOMER INTERACTION
WITH NUCLEAR MEMBRANE**

А.О. Травина¹, Н.В. Ильичева²

¹ *Санкт-Петербургский государственный технологический институт*

² *Институт цитологии РАН*

A.O. Travina¹, N.V. Ilicheva²

¹ *Saint Petersburg State Institute of Technology, Russia*

² *Institute of Cytology RAS, Russia*

Аннотация

За обеспечение функций теломер отвечает комплекс из шести белков, шелтерин. Теломер-специфические белки TRF1 и TRF2 являются дальними гомологами, однако в состав TRF2 входит домен, отсутствующий у TRF1, а функции этого домена неясны. Гомология между доменом TRF2 и некоторыми участками rod-доменов нейрофиламентов и ламинов может говорить о том, что данный домен отвечает за взаимодействие TRF2 с ядерной мембраной. Исследование механизмов взаимодействия теломер с ядерной мембраной необходимо для понимания процессов естественного клеточного старения и некоторых молекулярных аспектов развития прогерии.

Abstract

The shelterin complex of six proteins is responsible for implementation of telomere functions. TRF1 and TRF2 telomere-specific proteins are extended homologues, however TRF2 contains a domain that is absent in TRF1, and the functions of this domain are unclear. The homology between TRF2 domain and some sequences of rod domains of neurofilaments and lamins may point out that this domain is responsible for interaction of TRF2 with the nuclear membrane. Investigation of

mechanisms of telomere interaction with a nuclear membrane is necessary for understanding the processes of normal cellular ageing and some of molecular aspects of development of progeria syndrome.

Целью работы являлось создание методики, позволяющей получать полипептид, соответствующий домену TRF2 с неизвестными функциями, в количествах необходимых для исследования неизвестных функций домена TRF2 и механизмов его вероятного взаимодействия с ядерной мембраной и достаточной чистоты для разработки антител к полипептиду.

Для получения полипептида udTRF2 использовали бактериальный штамм-продуцент (*E. coli* RosettaBlue (DE3)-pET32a-udTRF2). Экспрессию индуцировали внесением в среду IPTG до концентрации 0,4 мМ. После лизирования бактериальных клеток полипептид находился в растворимой фракции клеточного лизата.

При фракционном осаждении лизата возрастающими концентрациями сульфата аммония выделяемый полипептид наиболее полно и с меньшим количеством посторонних белковых примесей осаждался при 35 % насыщении.

Были подобраны условия выделения целевого полипептида методом ионообменной хроматографии. Для хроматографии использовали Q-сефарозу, элюцию проводили градиентом NaCl.

Целевой полипептид выделили из водного экстракта комбинацией методов высаливания и ионообменной хроматографии. Фракцию, осажденную при 35 % насыщении, подвергли дальнейшей очистке методом ионообменной хроматографии. Количество посторонних белковых примесей было определено с помощью компьютерной программы для анализа изображений ImageJ 1.46 и составило 10 %. Концентрация целевого полипептида в полученном растворе – 0,25 мг/мл.

Результаты

В дальнейшем раствор целевого полипептида, полученный согласно разработанной методике, может быть использован для разработки моноклональных антител и для экспериментов по изучению механизмов взаимодействия теломер-специфического белка TRF2 с белками ядерной ламины.

**ВЛИЯНИЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I
В КОМПЛЕКСЕ С ЭСТРОНОМ НА БИОСИНТЕЗ ДНК
В КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС**

INFLUENCE OF APOLIPOPROTEIN A-I IN COMPLEX WITH ESTRON
ON DNA BIOSYNTHESIS IN THE CULTURE OF RAT HEPATOCYTES

Н.В. Трифонова

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биохимии»

N.V. Trifonova

«Research Institute of Biochemistry», Russia

e-mail: Nataliya.V.T@yandex.ru

Аннотация

В работе показано, что аполипопротеин А-I (апоА-I) образует комплекс с женским половым гормоном – эстроном. Рассчитана константа связывания (Kс) апоА-I с гормоном. На культуре гепатоцитов крыс показано, что комплекс апоА-I – эстрон усиливает пролиферацию гепатоцитов крыс по отношению к гормону без переносчика. Предполагается, что полученный эффект реализуется посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Abstract

The paper shows that apolipoprotein AI (apoA-I) forms a complex with a female sex hormone – estrone. Calculated binding constant for complexes apoA-I-hormone. In the culture of rat hepatocytes demonstrated that complex apoA-I-estrone enhances the proliferation of rat hepatocytes against the simple hormone without a carrier. It is assumed that the resulting effect is realized by means of receptor-mediated endocytosis.

Известно, что с липопротеинами крови переносится не менее 40 % стероидных гормонов, включая кортизол, кортикостерон, тестостерон, прогестерон. Ранее, в работах НИИ биохимии было показано, что стероидные гормоны способны образовывать устойчивые комплексы с липопротеинами плазмы крови. Наиболее высокое сродство к стерои-

дам обнаружено для липопротеинов высокой плотности. Эти результаты позволяют сделать предположение о способности стероидных гормонов проникать в клетку в составе липопротеиновых комплексов [1].

Целью данного исследования явилось изучение способности апоА-I образовывать комплекс с эстроном и оценить влияние апоА-I в комплексе с гормоном на биосинтез ДНК в культуре гепатоцитов крыс.

Материалы и методы исследования

Для эксперимента использовали крыс-самцов линии Wistar, массой 180- 200 г. Первичные гепатоциты изолировали с помощью 2-х стадийной ферментативной перфузии печени, как описано в работе Papeleu P. et al. [4]. Липопротеины выделяли из плазмы крови методом изоплотного ультрацентрифугирования в растворах КВг в присутствии 3 мМ ЭДТА-Na₂ [6]. Полученную фракцию липопротеинов высокой плотности (ЛПВП, $1,063 < d < 1,21$ г/мл) делипидировали охлажденной смесью хлороформ-метанол (1:1) с последующей многократной отмывкой эфиром. Для выделения апоА-I суммарные белки ЛПВП наносили на колонку (1,6 x 100 см) с Сефарозой 6В-CL и элюировали 0,01 М Трис-HCl буфером, pH 8,6, содержащим 6 М мочевины, 0,01 % азид натрия и 1 мМ фенолметансульфонилфторид. Проверку чистоты апоА-I осуществляли методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

Методом тушения триптофановой флуоресценции оценивали взаимодействие апоА-I с эстроном на спектрофлуориметре MPF-4 «Хитачи» (Япония) при длине волны возбуждения 285 нм и эмиссии в диапазоне от 300 до 450 нм [3]. В работе использовали раствор эстрона ($5,5 \times 10^{-3}$ М) в 96 % этаноле. Титрование проводили добавлением аликвот стероидного гормона (1 мкл) к 2 мл раствора апоА-I. Концентрация этанола в конечном объеме не превышала 0,5 %. Расчет константы и число мест связывания осуществляли по методу Аттала и Лата [2].

Скорость биосинтеза ДНК в культуре гепатоцитов определяли по включению радиоактивной метки ³H-тимидин, в количестве 2 мКи/мл среды. Количественное определение белка проводили по методу Варбурга и Кристиана, как описано в работе Suzuki T. [5].

Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Методом тушения триптофановой флуоресценции показано взаимодействие апоА-I с эстроном. Снижение флуоресценции составило 38 %.

На основании кривых тушения флуоресценции рассчитана константа ассоциации при взаимодействии апоА-I с эстроном, которая составила $0,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Полученные данные говорят об образовании достаточно стабильного комплекса апоА-I-эстрон.

На культуре гепатоцитов крыс показано, что комплекс апоА-I-эстрон при добавлении в среду инкубации увеличивает скорость биосинтеза ДНК, определяемую по включению ^3H -тимидина, в 4,4 раза по отношению к контрольной группе (рис. 1).

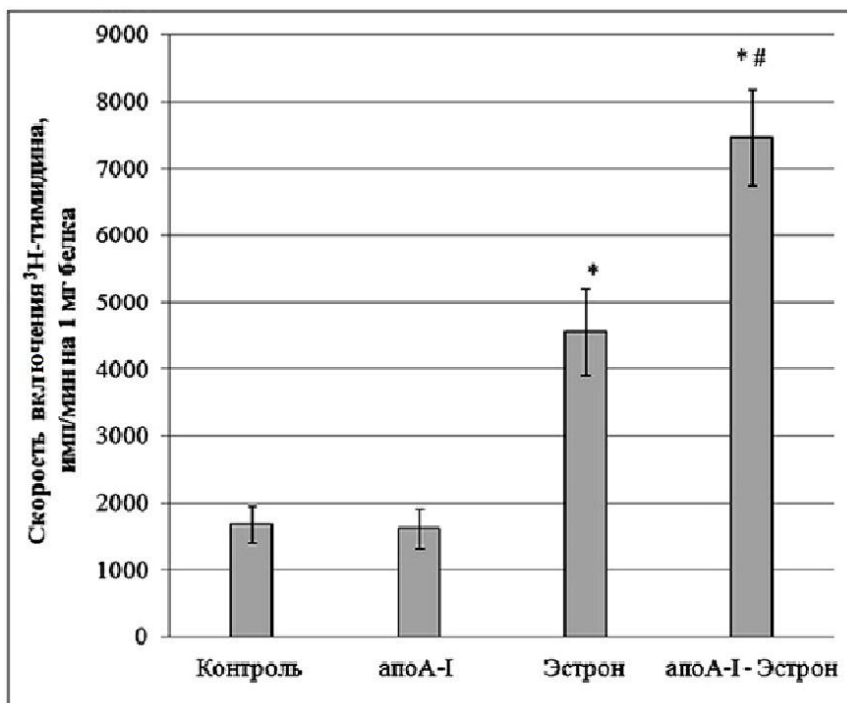


Рис. 1. Изменение скорости биосинтеза ДНК в гепатоцитах крыс под влиянием комплекс апоА-I-эстрон. * – достоверное различие по сравнению с контролем ($p < 0,001$). # – достоверное различие по сравнению с эстроном ($p < 0,05$)

В группе, где присутствовал только эстрон, также наблюдалось увеличение скорости биосинтеза ДНК в 1,6 раза по сравнению с контролем. Добавление «чистого» апоА-I оставляло скорость биосинтеза ДНК на

уровне контрольных значений. Отличие эффектов в группе эстрон и апоА-I-эстрон можно объяснить тем, что на поверхности гепатоцитов присутствуют рецепторы к апоА-I, таким образом, комплекс апоА-I с эстроном попадает в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, что, в свою очередь, является более эффективным в реализации биологического эффекта эстрогена. Таким образом, можно сделать вывод, что данный механизм регуляции является универсальным и может играть важную роль в процессах внутриклеточной регенерации и пролиферации.

Литература

1. Панин Л.Е. Транспортные формы стероидных гормонов в крови, их связь с развитием некоторых физиологических и патологических процессов // Бюллетень сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 32. № 1. С. 31–37.
2. Attallah N. A., Lata G. F. Steroid-protein interactions studied by fluorescence quenching // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*. 1968. Т. 168. №. 2. С. 321–333.
3. Baharuddin A., Amir Hassan A., Othman R., Xu Y., Huang M., Ario Tejo B., Yusof R., Abdul Rahman N., Othman, S. Dengue Envelope Domain III-Peptide Binding Analysis via Tryptophan Fluorescence Quenching Assay // *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2014. Т. 62. №. 10. С. 947–955.
4. Papeleu P., Vanhaecke T., Henkens T., Elaut G., Vinken M., Snykers S., Rogiers V. Isolation of Rat Hepatocytes // *Methods in Molecular Biology, Cytochrome P450 Protocols: Second Edition*, 2006. Vol. 320. P. 229–237
5. Suzuki T. Isolation of Synapse Subdomains by Subcellular Fractionation Using Sucrose Density Gradient Centrifugation // *Neuroproteomics, Neuromethods*. 2011. Vol. 57. P. 47–61.
6. Yuana Y., Levels J., Grootemaat A., Sturk A., Nieuwland R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2014. Vol. 3. P. 1–5.

БЕЛКОВАЯ ИНТЕРАКТОМИКА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ *

PROTEIN INTERACTOMICS: PROBLEMS AND PROSPECTS OF THE EXPERIMENTAL RESEARCH

А.В. Флоринская, А.С. Иванов

*ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени В.Н. Ореховича (ИБМХ)*

Аннотация

Разработан оригинальный экспериментальный метод прямого молекулярного фишинга для выявления потенциальных белков-партнеров белок-белковых взаимодействий. Подход основан на совместном применении технологий поверхностного плазмонного резонанса (SPR), гель-фильтрационной и аффинной хроматографий и масс-спектрометрической идентификации белков (LC-MS/MS). Фишинг на аффинных сорбентах с иммобилизованными в качестве лигандов целевыми белками выполнялся из полного лизата биологического материала и его отдельных фракций, полученных индивидуально для каждого белка-наживки с помощью комбинации гель-хроматографии и SPR анализа. Разработан также системный подход к идентификации стабильных нативных белковых комплексов, основанный на сочетании гель-хроматографического фракционирования лизата биологического материала, LC-MS/MS идентификации белков во фракциях и биоинформатическим анализом полученных результатов.

Abstract

An original experimental method of direct molecular fishing has been developed for identification of potential partners of protein-protein interactions. It is based on combination of surface plasmon resonance technology (SPR), size exclusion and affinity chromatography and LC-MS/MS identification of proteins. Fishing on the affinity sorbents with immobilized target proteins as ligands was carried out using total lysate of biological samples and its separate fractions, individual for each bait-protein, obtained by using combination of size exclusion chromatography (SEC) and SPR analysis. We also developed a systematic approach to the identification of stable protein complexes in the lysate of biological material. This approach is based on the combination of SEC fractionation of lysate, LC-MS/MS proteins identification in all fractions and bioinformatic analysis of the obtained results.

* Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 16-04-00057).

Изучение белок-белковых взаимодействий расширяет наше понимание того факта, что большинство белков в живых системах функционирует в составе стабильных или временных молекулярных комплексов. Для этого применяются различные подходы с использованием биоинформатических, геномных и биохимических технологий. Среди последних наиболее перспективными считаются подходы с применением принципа молекулярной рыбалки (молекулярного фишинга), основанного на вылавливании из лизата биологического материала отдельных белковых комплексов и LC-MS/MS идентификации белков-партнеров. По сути, молекулярный фишинг является вариантом аффинного выделения целевых молекул с использованием специфического взаимодействия иммобилизованного лиганда (молекула-наживка) с белками-партнерами (молекулы-добычи). Нами был разработан оригинальный экспериментальный метод прямого молекулярного фишинга (рис. 1) для выявления потенциальных белков-партнеров, основанный на совместном применении технологий поверхностного плазмонного резонанса (SPR), гель-фильтрационной и аффинной хроматографий и масс-спектрометрической идентификации белков (LC-MS/MS).



Рис. 1. Схема прямого молекулярного фишинга потенциальных белков-партнеров целевого белка-лиганда

Молекулярный фишинг из лизата ткани печени с использованием в качестве лигандов двух белков, кодируемых генами 18-й хромосомы человека, митохондриального цитохрома b5 (CYB5A) и транстиретаина (TTR), а также BSA в качестве независимого контроля, выявил три больших набора потенциальных белков-партнеров (рис. 2).

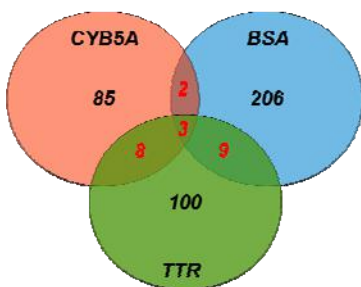


Рис. 2. Прямой фишинг из лизата ткани печени человека

Выборочная проверка с помощью SPR биосенсора взаимодействия идентифицированных белков с белком-наживкой CYB5A подтвердила наличие «в улове» прямых белков-партнеров, но не исключила возможности присутствия не специфических примесей.

Сравнительный анализ данных наборов показал высокую специфичность их состава, о чем свидетельствует низкий уровень пересечения списков белков в наборах. Большое число потенциальных белков-партнеров в «улове» обусловлено, по видимому, выделением не только прямых партнеров белка-наживки, но и надмолекулярных комплексов, состоящих из партнеров высших порядков, а также не специфических комплексов и мицелл, в составе которых есть белки-партнеры.

Для повышения эффективности данного подхода мы также разработали технологию аналитического молекулярного фишинга, основанного на высокоэффективном гель-хроматографическом фракционировании лизата и SPR анализе присутствия потенциальных молекул-добычи в каждой фракции (рис. 3).

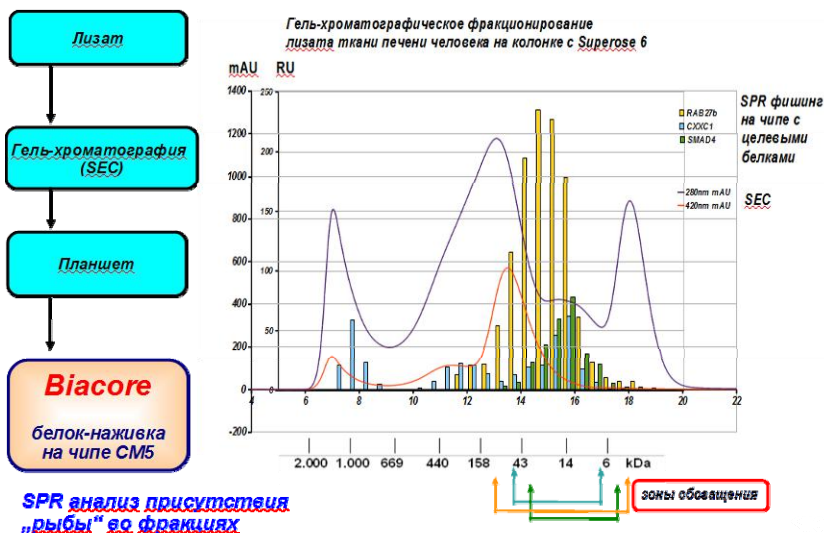


Рис. 3. Сочетание гель-хроматографического фракционирования лизата с SPR анализом – аналитический фишинг

Однако описанные выше подходы охватывают лишь локальные участки белкового интерактома и не обеспечивают его системный (омикс) анализ. Поэтому особенно актуальна задача разработки новых экспериментальных подходов к системному анализу белковых интерактомов. Нами начата разработка одного из таких подходов для идентификации белков, участвующих в формировании стабильных белковых комплексов. Подход основан на сочетании гель-хроматографического фракционирования лизата биологического материала, LC-MS/MS идентификации белков во фракциях и биоинформатическим анализом полученных результатов. Возможность реализации данного подхода была проверена в пилонном эксперименте с анализом белковых комплексов в общем лизате ткани печени человека. Результаты показали, что подход позволяет получить конкретную информацию для каждого идентифицированного белка о числе и размерах комплексов, в формировании которых он участвует, а также о его потенциальных белках-партнерах. В шести выбранных фракциях лизата ткани печени человека суммарно был идентифицирован 981 белок, что составляет около 40 % от общего количества белков печени человека, зарегистрированных в базе Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). В зависимости от профиля распределения по фракциям, все идентифицированные белки можно разделить на четыре группы: (1) одиночные белки, находящиеся в мономерном состоянии и не участвующие в формировании стабильных белковых комплексов; (2) белки, существующие в виде гомо- или гетеро-димеров с соразмерными с ними партнерами; (3) белки, находящиеся частично как в мономерном состоянии, так и в составе белковых комплексов; (4) белки, не существующие в свободной мономерной форме, а находящиеся только в составе сложных комплексов с числом субъединиц 3 и более.

Полученные результаты могут стать основой нового экспериментального подхода к системному изучению белкового интерактома. Использование методов биоинформатики позволит выдвинуть гипотезы о составе конкретных белковых комплексов и парах белков-партнеров и построить сети белок-белковых взаимодействий.

РОЛЬ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ В РАЗВИТИИ ПРОЛАПСА ТАЗОВЫХ ОРГАНОВ У ЖЕНЩИН *

VARIABILITY OF BONE MINERAL DENSITY GENES AND PELVIC ORGAN PROLAPSE DEVELOPMENT AMONG WOMEN

М.Б. Хаджиева^{1,2}

¹ *Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

² *Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дм. Рогачева, Москва, Россия*

M.B. Khadzhieva^{1,2}

¹ *N.I. Vavilov Institute of General Genetics,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

² *Dm. Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Moscow, Russia*

e-mail: m.had@mail.ru

Аннотация

В результате изучения роли варибельности генов минеральной плотности костной ткани (*SP7*, *LOC100507377*, *MEPE*, *SPTBN1*, *WLS*, *LOC101929163*, *CCDC170*) в развитии пролапса тазовых органов у женщин, выявлены полиморфные варианты генов *SP7* (rs2016266) и *CCDC170* (rs4870044), связанные с развитием данного заболевания.

Abstract

This study was conducted to investigate the association of polymorphisms of bone mineral density genes (*SP7*, *LOC100507377*, *MEPE*, *SPTBN1*, *WLS*, *LOC101929163*, *CCDC170*) with pelvic organ prolapse (POP) among women. We revealed significant associations of SNPs rs2016266 (*SP7*) and rs4870044 (*CCDC170*) with POP.

Пролапс тазовых органов (ПТО) – заболевание, характерное преимущественно для женщин постменопаузального возраста и представляющее

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №15-04-02378).

собой смещение тазовых органов из их физиологического положения во влагалище или через влагалище наружу. Основной причиной развития ПТО является ослабление, перерастяжение или повреждение тканей связочного аппарата тазовых органов, спровоцированное старением и родами через естественные родовые пути, в особенности осложненных родовыми травмами, макросомией плода, оперативными вмешательствами и неоднократными родами.

Зарубежными коллегами доказана сопряженность ПТО с остеопорозом среди женщин постменопаузального возраста, что, по мнению исследователей, может быть обусловлено нарушением структуры соединительной ткани, в частности нарушением метаболизма коллагена (PMID: 25325183). Ранее с использованием каталога PheWAS (Phenome-Wide Association Study), содержащего результаты полногеномных исследований пациентов-европеоидов с доступными электронными историями болезней, нами было выявлено, что генетические варианты, контролирующие по результатам полногеномных исследований в каталоге GWAS (Genome-Wide Association Studies) минеральную плотность костной ткани (МПКТ), ассоциированы с ПТО (PMID: 27126235).

Цель

Изучение роли вариабельности генов, контролирующих минеральную плотность костной ткани (по каталогу GWAS), в генезе пролапса тазовых органов посредством валидации на российской выборке связи полиморфных вариантов rs2016266 (*SP7*), rs10506701 (*LOC100507377*), rs1471403 (*MEPE*), rs11898505 (*SPTBN1*), rs2566755 (*WLS*), rs3130340 (*LOC101929163*), rs4870044 (*CCDC170*) с развитием ПТО.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 605 пациенток, проходивших лечение на клинических базах кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова. Основную группу составили 248 женщин с ПТО II-IV стадии по системе POP-Q (основная группа) и 357 без генитального пролапса (контрольная группа); средний возраст в группах $57,78 \pm 8,77$ и $55,99 \pm 10,44$ лет, соответственно. ДНК из цельной крови выделяли с помощью наборов Diatom DNA Prep 200 (Изоген, Россия). Генотипирование проводилось методом тетра-праймерной аллель-специфической ПЦР (наборы GenPak PCR Core, Изоген, Россия). Подбор праймеров выполнялся в программе Primer3web version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) с последующей оптимизацией условий ПЦР. Оценка частот генотипов и их эффектов оценивалась методом логистического регрессионного анализа с помощью компьютерной программы SNPStats.

Результаты

Все изученные сайты кроме rs1471403 (*MEPE*) находились в состоянии равновесия по Харди-Вайнбергу, в связи с чем данный вариант был исключен из статистической обработки результатов. В общей выборке с учетом клинических факторов риска (возраста, индекса массы тела, количества родов и наличия/отсутствия родовых травм) был выявлен протективный аллель rs4870044-Т гена *CCDC170* (доминантная модель; $P=0,025$, $OR=0,65$, 95 % ДИ: 0,45-0,95), достоверно чаще встречающийся среди женщин без ПТО. Аналогичный эффект аллеля rs4870044-Т также был зарегистрирован в группе с индексом массы тела (ИМТ) от 25 и выше (аддитивная модель; $P=0,015$, $OR=0,64$, 95 % ДИ: 0,45-0,92), в группе с недержанием мочи (доминантная модель; $P=0,0028$, $OR=0,42$, 95 % ДИ: 0,23-0,75) и неоднократными родами (доминантная модель; $P=0,029$, $OR=0,56$, 95 % ДИ: 0,34-0,95). Функция гена *CCDC170* (coiled-coil domain containing 170) не известна, однако по результатам GWAS данный ген связан с развитием рака молочной железы и МПКТ. Пороговую значимость в общей выборке без учета клинических факторов риска показал протективный аллель rs2016266-G гена *SP7* (рецессивная модель; $P=0,058$, $OR=0,54$, 95 % ДИ: 0,28-1,04), зарегистрированный также в стартах с травмами мягких родовых путей (рецессивная модель; $P=0,005$, $OR=0,20$, 95 % ДИ: 0,06-0,68), цистоцеле (аддитивная модель; $P=0,013$, $OR=0,65$, 95 % ДИ: 0,46-0,92) и в группе с ИМТ от 25 и выше (рецессивная модель; $P=0,036$, $OR=0,37$, 95 % ДИ: 0,14-0,97). По данным каталога GWAS сайт rs2016266-G гена *SP7* также является протективным в отношении низкой МПКТ. Sp7 – транскрипционный фактор с доменами типа "цинковые пальцы", связывающийся с богатыми G/C-последовательностями, отвечает за дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток и остификацию костной ткани. По литературным данным *SP7* связан с развитием несовершенного остеогенеза XII и IV типа. На мышинных преостеобластах показано, что взаимодействуя с G/C-богатыми проксимальными промоторными участками генов *Col1a2* (альфа-2 цепь коллагена I типа) и *Col5a1* (альфа-1 цепь коллагена V типа), *SP7* повышает уровень экспрессии данных генов (PMID: 25172663; PMID: 20888414). Таким образом, *SP7* может играть важную роль в развитии пролапса тазовых органов, опосредованно влияя на прочность поддерживающего аппарата за счет взаимодействия с проколлагенами различных типов.

Выводы

Вариабельность генов, отвечающих за МПКТ, в частности *SP7* (rs2016266) и *CCDC170* (rs4870044), связана с развитием пролапса тазовых органов.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *BRCA1* В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

EXPRESSION OF THE *BRCA1* GENE IN A BREAST TUMOR: CORRELATION WITH THE EFFECT OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, И.В. Дерюшева

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Томский национально исследовательский медицинский центр
Российской академии наук», Томск, Россия*

M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, I.V. Deryusheva,
Cancer Research Institute, Tomsk NRMC

Аннотация

Большинство современных исследований ограничены изучением лишь герминальных мутаций гена *BRCA1* (чаще всего 5382insC) и очень мало работ, которые характеризуют различные соматические изменения гена *BRCA1* в опухоли. С учетом того, что различные мутации генов, такие как хромосомные aberrации (Litviakov, N.V., et al., 2016), генетические полиморфизмы (Литвяков Н.В. и др., 2011), потеря гетерозиготности и др. могут оказывать влияние на эффективность лечения, то можно предположить, что и экспрессия гена *BRCA1*, так же будет ассоциирована с чувствительностью новообразования к лечению. Цель работы: оценить связь уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НХТ). Было исследовано 86 больных раком молочной железы (РМЖ). Оценена экспрессия *BRCA1* в опухолевом материале до и после НХТ. Показана слабая корреляция с клинико-морфологическими параметрами пациентов. Было установлено, что объективный ответ на НХТ сопряжен с высоким уровнем *BRCA1* в общей группе больных ($p=0,01$) и при применении доцетаксела в монорежиме ($p=0,049$).

Abstract

Most modern studies are limited to the study of only germline mutations of the *BRCA1* gene (most often 5382insC) and very few studies that characterize the different somatic changes in the *BRCA1* gene in the tumor. Given the fact that various gene mutations, such as chromosomal aberrations (Litviakov, N.V., et al., 2016), genetic polymor-

phisms (Litviakov, N.V., et al., 2011), loss of heterozygosity, etc., may affect the effectiveness treatment, it can be assumed that the expression of the *BRCA1* gene will also be associated with the sensitivity of the neoplasm to treatment. Aim: to evaluate the correlation between expression of the *BRCA1* gene in a breast tumor with neoadjuvant chemotherapy (NACT) efficiency. The research included 86 patients with breast cancer (BC). We evaluated the expression of *BRCA1* in tumor material before and after NACT. We established that objective response to NACT is connected with a high level of *BRCA1* in the general group of patients ($p=0.01$) and in case of docetaxel monotherapy ($p<0.049$).

Материалы и методы

В исследование было включено 86 больных РМЖ со стадией ПА – ПИВ, получавших в 2006-2010 годах лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ. все больные получали 2–4 курса неoadъювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода), СМХ (циклофосфан, метотрексат, кселода), СР (циклофосфан, цисплатин), АР (доксорубин, цисплатин) и монотерапию таксотером. Затем проводилась операция и 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. РНК выделяли из 86 парных образцов до и после лечения с помощью набора RNeasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Оценку экспрессии гена *BRCA1* проводили при помощи qRT-PCR. Относительная экспрессия была оценена с помощью метода Pfaffl, относительно гена-рефери *GAPDH* и нормальной ткани молочной железы.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., USA). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>).

Результаты

На первом этапе нашего исследования мы оценили уровень экспрессии гена *BRCA1*. Среднее значение экспрессии данного гена до лечения составило $0,85 \pm 0,1$ в операционном материале после НХТ – $0,65 \pm 0,08$. Далее мы оценили ассоциацию уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли до лечения с эффектом НХТ в общей группе и при различных схемах лечения. Начальный уровень экспрессии гена *BRCA1* и эффект НХТ при разных схе-

мах химиотерапии представлен на рис. 1. На рисунке хорошо видно, что экспрессия *BRCA1* сильно варьирует.

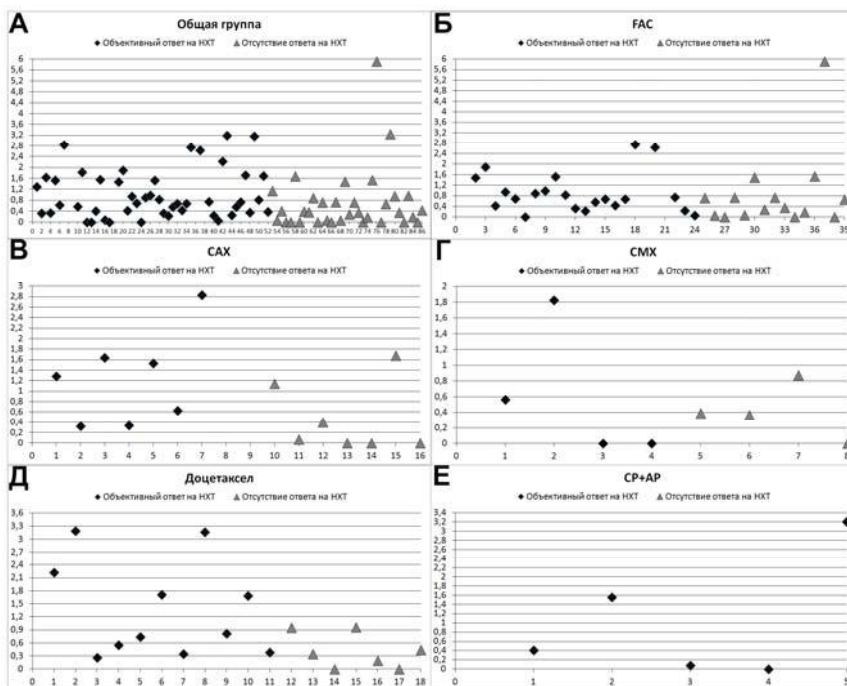


Рис. 1. Вариабельность начального уровня экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы у пациентов при различных схемах и эффекте неоадьювантной химиотерапии. *Примечание:* А – в общей группе больных (n=86); Б – при схеме химиотерапии FAC (n=39); В – при схеме химиотерапии САХ (n=16); Г – при схеме химиотерапии CMX (n=8); Д – при монотерапии доцетакселом (n=18); Е – при схеме химиотерапии СР+АР (n=5); по оси абсцисс расположен номер пациента, по оси ординат уровень экспрессии гена *BRCA1*

Оценка связи экспрессии исследуемого гена с эффектом НХТ показала, что статистически достоверные различия между группой с наличием объективного ответа и группой с отсутствием ответа на НХТ характерны для общей группы больных ($p=0,01$) и для пациентов пролеченных доцетакселом в монорежиме ($p=0,05$), (Таблица 1). В обоих случаях уровень экспрессии исследуемого гена выше в группе пациентов с объективным ответом на химиотерапию.

Таблица 1

**Связь экспрессии гена *BRCA1* с эффективностью
неоадьювантной химиотерапии**

Схема НХТ	Объективный ответ на НХТ	Отсутствие ответа на НХТ	p-level
Общая группа	0,99±0,12	0,69±0,19	0,01
FAC	0,90±0,16	0,84±0,38	0,15
CAX	1,22±0,33	0,47±0,25	0,08
CMX	0,59±0,43	0,40±0,18	1
Доцетаксел	1,36±0,33	0,41±0,15	0,049
CP+AP	1,05±0,35	0,0±0,0	1

При этом стоит отметить, что при изначально высоком уровне экспрессии гена в общей группе должно наблюдаться отсутствие ответа на НХТ из-за высокой репаративной активности, мы наблюдаем обратный эффект. В этом случае стоит обратить внимание на изменение экспрессии гена в процессе химиотерапии. В 74 % случаев (26/35) при наличии объективного ответа на НХТ у пациентов наблюдается снижение экспрессии *BRCA1*, тогда как при отсутствии эффекта на лечение у 64 % (18/28) больных экспрессия повышается (Fisher test, $p=0,004$).

Выводы

Таким образом, в результате проведенного исследования была показана связь экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с эффективностью неоадьювантной химиотерапии. На основании полученных данных можно полагать, что экспрессия гена *BRCA1* может также являться маркером эффективности неоадьювантной химиотерапии (в частности таксотером), но это требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Ibragimova M.K., Cherdyntseva N.V., Kzhyskhovska J., Slonimskaya Y.M., Kazantseva P.V., Choinzonov E.L. Deletions of multidrug resistance gene loci in breast cancer leads to the down-regulation of its expression and predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy // Oncotarget. 2016. Vol. 7, № 7. P. 7829–7841.
2. Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Цыганов М.М., Денисов Е.В., Мерзлякова М.К., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М. Ассоциация генетического полиморфизма с изменением экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы в процессе неоадьювантной химиотерапии // Медицинская генетика. 2011. Т. 10, № 10 (112). С. 37–43.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ МЕТАБОЛОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА

QUANTITATIVE METABOLOMIC PROFILING OF THE HUMAN EYE TISSUES

В.В. Яньшолё, Л.В. Яньшолё, О.А. Снытникова, Ю.П. Центалович

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт «Международный томографический центр»
Сибирского отделения Российской академии наук*

V.V. Yanshole, L.V. Yanshole, O.A. Snytnikova, Yu.P. Tsentalovich

International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk, Russia

e-mail: vadim.yanshole@tomo.nsc.ru

Аннотация

Применение методов количественной метаболомики указывает на существенное снижение концентраций наиболее важных метаболитов, необходимых для защиты хрусталика глаза человека, в катарактальных хрусталиках по сравнению с нормальными хрусталиками. Данное уменьшение содержания метаболитов наиболее вероятно связано с нарушением функционирования эпителиальных клеток хрусталика при развитии возрастной катаракты.

Abstract

Quantitative metabolomics approach reveal that the levels of the most important for the lens protection metabolites in cataractous lenses are significantly lower than that in normal lenses. Most probably this is due to the dysfunction of the lens epithelial cells under age-related cataract development.

Introduction

Cataract, or clouding of the eye lens, is the leading cause of vision impairment in the world according to World Health Organization. The lens tissue to be transparent has a very specific structure: it does not have the vascular system, lens fiber cells lack of nuclei and organelles, and the lens proteins – crystallins –

do not turnover throughout the lifespan. The transparency of the eye lens depends on the integrity of crystallins which may undergo numerous posttranslational modifications throughout the lifespan. The protection of lens proteins is provided solely by various small molecules – metabolites, which diffuse into the lens from the aqueous humor (AH) or are synthesized in metabolically active cells of the lens epithelial monolayer. The further metabolite transport inside the lens is proposed to be driven by passive diffusion or active Na^+ ion currents, but the contribution of each mechanism is still unknown. Therefore, the study of changes in the metabolite composition of a cataractous lens and AH as compared to normal tissues may elucidate the possible mechanisms responsible for the cataract formation.

Methods

Quantitative metabolomic profiles were obtained for the four types of tissues: normal lenses and corresponding AH obtained post-mortem and cataractous lenses and corresponding AH obtained after cataract surgery. We used the combination of two methods – high-frequency ^1H nuclear magnetic resonance (NMR, 700 MHz) and ion-pairing high-performance liquid chromatography with high-resolution ESI-q-TOF mass-spectrometric detection (LC-MS) for the identification and quantification of metabolites. NMR-based quantification was achieved with the use of one internal standard DSS, while LC-MS quantification required the construction of the calibration curves for each metabolite under study using the commercially-available chemical standards. For the measurements of the metabolites spatial distribution a specific method has been developed: the tissue was cut into slices on cryotome along the axis of interest, and the slices were further quantitatively analyzed by LC-MS.

Results

Spatial distribution of 34 metabolites along the optical and equatorial axes of the human lens has been determined. For the majority of metabolites, the homogeneous distribution has been observed. That suggests that the rate of the metabolite transformation in the lens is low due to the general metabolic passivity of the lens fiber cells. However, the redox processes are active in the lens; as a result some metabolites including antioxidants, demonstrate the “nucleus-depleted” type of distribution, whereas secondary UV filters show the “nucleus-enriched” type. The metabolite concentrations at the lens poles and equator are similar for all metabolites under study.

The concentrations of a total of 86 metabolites were determined in four types of tissues. In cataractous lens the most abundant metabolites are (in descending order): myo-inositol, lactate, acetate, glutamate, glutathione; in AH –

lactate, glucose, glutamine, alanine, valine. The concentrations of nucleotides, UV filters, antioxidants and some other metabolites in the lens are much higher than that in AH, while the levels of glucose and hydroxybutyrates are lower. The concentrations of the majority of metabolites in normal post-mortem samples of both lens and AH are higher than that in samples from the cataract patients.

Conclusions

The combination of NMR and LC-MS methods turned out to be very fruitful and reliable for metabolite identification and quantification. The concentric pattern of the “nucleus-depleted” and “nucleus-enriched” distributions testifies that the metabolite distribution inside the lens is mostly governed by a passive diffusion, relatively free along the fiber cells and retarded in the radial direction across the cells.

The most important for the lens protection metabolites – antioxidants, UV filters, osmolytes – are synthesized or actively transported by the lens epithelial cells. The reduced levels of these metabolites were found in the cataractous lenses; that indicates that the cataract development may originate from the dysfunction of the lens epithelial cells. The increase in the concentrations in normal post-mortem tissues for the majority of metabolites corresponds to the post-mortem processes.

**ИЗУЧЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ДВУХ ФРАГМЕНТОВ
ГЕНА COX1 ДЛЯ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ
ВИДОВ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК
СЕМЕЙСТВ *LUBOMIRSKIIDAE* И *SPONGILLIDAE* ***

STUDY OF TWO FRAGMENTS OF COX1 GENE VARIABILITY
FOR CLOSEST-SPECIES OF BAIKAL SPONGE
LUBOMIRSKIIDAE AND *SPONGILLIDAE* FAMILIES

А.С. Яхненко, В.Б. Ицкович

*ФГБОУ ВО «ИГУ»
ФГБУН Лимнологический Институт СО РАН*

A.S. Yakhnenko, V.B. Itskovich

*ISU, Irkutsk, Russia
Limnological Institute Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

e-mail: yakhnenkoas@gmail.com

Аннотация

Участок митохондриального гена COX1 (Folmer fragment) используется для видовой идентификации различных групп билатеральных организмов, но для губок он недостаточно вариабелен. В свете этого было предложено использовать другой участок гена COX1 для видовой идентификации морских губок. По данным Erpenbeck с соавторами [3], для некоторых морских губок филогенетический анализ по новому участку гена *cox1* показал отчетливые различия в рангах ниже семейств. В настоящей работе был проведен сравнительный анализ вариабельности двух участков гена COX1 для близкородственных видов байкальских губок семейств *Lubomirskiidae* и *Spongillidae*. Показано, что фрагмент Эрпенбека наряду с фрагментом Фолмера, является недостаточно вариабельным для видовой идентификации близкородственных байкальских губок, однако нуклеотидные и аминокислотные замены во фрагменте Эрпенбека являются эволюционно более значимыми.

* Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 17-04-01598.

Abstract

The site of the mitochondrial gene COX1 (Folmer fragment) is used for species identification of different groups of bilateral organisms, but for sponges it is not sufficiently variable. In case of this, it has been proposed to use a different portion of the COX1 gene for the species identification of marine sponges. According to Erpenbeck et al. [3], for some marine sponges, phylogenetic analysis for the new section of the *cox1* gene showed distinct differences in the rankings below the families. In the present work, a comparative analysis of the variability of two sections of the COX1 gene for closely related species of Baikal sponges of the families Lubomirskiidae and Spongillidae was carried out. It is shown that the Erpenbek fragment along with the Folmer fragment is not sufficiently variable for species identification of closely related Baikal sponges, however, nucleotide and amino acid substitutions in the Erpenbek fragment are evolutionarily more significant.

Губки (Porifera) являются одними из древнейших многоклеточных животных. В связи с широкой нормой реакции и высокой вариабельностью внешних признаков таксономия губок очень запутана. Ранее она была основана лишь на морфологических признаках. На сегодняшний день развитие методов молекулярного анализа позволяет изучать взаимоотношения между видами при помощи молекулярных маркеров.

В 2003 году Hebert с соавторами [5] предложил определять вид и другие таксоны множества групп организмов путем сравнения участка митохондриального гена *cox1* исследуемого образца с уже имеющимися в банке данных последовательностями. Праймеры для этого фрагмента были впервые освещены Folmer (1994) [4].

Интересно, что тогда как участки мтДНК с успехом используются для низкоуровневой филогении для высших многоклеточных, мтДНК двухслойных животных является очень консервативной. Разрешающая способность выбранного участка гена *cox1* подходит для изучения филогении семейств морских и пресноводных губок [2, 9], но не рангов ниже.

Однако, возможность использовать ген *cox1* для видовой идентификации губок и других диплобласт предполагают исследователи Erpenbeck et al. (2006a) [3], при условии, что используется верный участок гена. Для некоторых морских губок филогенетический анализ по гену *cox1* показал отчетливые различия в рангах ниже семейств [2, 7].

В этих исследованиях использовался участок гена *cox1* длиной 453 п.н., находящийся на 23 аминокислоты дальше фрагмента Folmer. Для того, чтобы определить, справедливы ли эти данные для байкальских губок, в данной работе был проведен сравнительный анализ характера замен для обоих участков гена *cox1* для близкородственных видов семейств Lubomirskiidae и Spongillidae.

Для фрагмента *cox1* Folmer в общей сложности было получено 42 последовательности. Для анализа были использованы 55 образцов, в том числе 17 образцов, опубликованных ранее Itskovich с соавторами [6]. После выравнивания последовательностей по фрагменту Folmer обнаружена 51 нуклеотидная замена. Все они являются трансверсиями. При этом 16 % замен находятся в первой позиции кодона, 84 % замен – в третьей позиции.

Имеющиеся замены во фрагменте Folmerгена *cox1* не являются видоспецифичными. Разные образцы вида *Sw.papyracea*, *B.i.intermedia* и *B.martinsoni* имеют различные гаплотипы. Также замены обнаружены в последовательностях образцов, отнесенных к видам *B.martinsoni*, *B.i.intermedia*, *B.abissalis*, *B. fungiformis*, *Sw.papyracea*, *S.lacustris*, *B.bacillifera*. Поскольку морфологические отличия у образцов одного вида не выявлены, наличие дивергентных гаплотипов COXI может указывать на скрытое видообразование.

Для фрагмента *cox1* Erpenbeck было проанализировано 55 образцов. После выравнивания было выявлено 41 замена нуклеотидов. Из них 39 % являются транзициями, 61 % – трансверсиями. 24,4 % замен находятся в первой позиции, 9,7 % замен – во второй позиции, 65,8 % – в третьей. Третья позиция кодона оказалась наиболее вариабельной, что совпадает с данными по морским губкам. [3]

Имеющиеся замены во фрагменте Erpenbeck гена *cox1* также не являются видоспецифичными, поскольку выявленные гаплотипы совпадают для разных видов. Замены обнаружены в последовательностях образцов, отнесенных к видам и подвидам: *B.fungiformis*, *B.i.profundalis*, *B.martinsoni*, *B.i.intermedia*, *Sw.papyracea*, *B.bacillifera*, *S.lacustris*, *Lubomirskiidae sp.*

Анализ полученных последовательностей для обоих участков гена *cox1* (55 образцов) показал трехкратное различие в соотношениях замен ак/нк для фрагмента Folmer (15,7 %) и Erpenbeck (48,7 %).

По полученным данным можно сделать вывод о том, что участок «Erpenbeck fragment» COXI гена является эволюционно более значимым.

Выводы

Для фрагмента Folmer показана внутри- и межвидовая вариабельность для видов *Sw. papyracea*, *B. fungiformis*, *S. lacustris*, *B. martinsoni* подвида *B.i. intermedia*.

Для фрагмента Erpenbeck показана внутри- и межвидовая вариабельность для видов и подвидов *B.martinsoni*, *B.i. profundalis*, *B.i. intermedia*, *B. fungiformis*, *Sw. papyracea* и *S. lacustris*, что делает его, наряду с фрагментом Folmer, непригодным для видовой идентификации близкородственных байкальских губок.

Обнаружено 12 новых дивергентных гаплотипов по фрагменту *Folmer* гена *cox1* и 10 по фрагменту Erpenbeck, что, вероятно, говорит о скрытом видообразовании у байкальских губок и требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Duran S., Giribet G., Turon X. Hylogeographical history of the sponge *Crambecrambe* (Porifera, Poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea // *Mol Ecol*. 2004. Vol. 13. P. 109–122.
2. Erpenbeck D., Breeuwer J. A. J., Velde H. C. Unravelling host and symbiont phylogenies of halichondrid sponges (Demospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker // *Marine Biology*. 2002. № 141. P. 377–386.
3. Erpenbeck D., Hooper J. N. A., Wreheide G. CO1 phylogenies in diploblasts and the ‘Barcoding of Life’ – are we sequencing a suboptimal partition? // *Molecular Ecology Notes*. 2006a. № 6. P. 550–553.
4. Folmer O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 1994. Vol. 3. P. 294–299.
5. Hebert P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 2003. № 270. P. 313–332.
6. Itskovich V. B. et al. Endemic Lake Baikal Sponges From Deep Water. 1: Potential Cryptic Speciation and Discovery of Living Species Known Only From Fossils // *Zootaxa*. 2015. Vol. 3990(1). P. 123–137.
7. Knowlton A. L. Sponges Dominant in the Alaska Intertidal: Biology, Ecology, and Genetic Diversity // *University of Alaska, Fairbanks, Alaska*. 2002.
8. Lavrov D. V. et al. Mitochondrial genomes of two demosponges provide insights into an early stage of animal evolution // *Molecular Biology and Evolution*. 2005. Vol. 22. P. 1231–1239.
9. Nichols S. A. An evaluation of support for order-level monophyly and interrelationships within the class Demospongiae using partial data from the large subunit rDNA and cytochrome oxidase subunit I // *Mol Phylogenet Evol*. 2005. № 34(1). P. 81–96.
10. Schrufer H. C. et al. Molecular phylogeny of the freshwater sponges in Lake Baikal // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2003. Vol. 41. P. 80–86.
11. Shearer T. L. et al. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria) // *Molecular Ecology*. 2002. Vol. 11(12). P. 2475–2487.
12. Wreheide G., Degnan B. M., Hooper J. N. A. Population phylogenetics of the common coral reef sponges *Leucetta* spp. and *Pericharax* spp. (Porifera: Calcarea) from the Great Barrier Reef and Vanuatu // In: Ninth International Coral Reef Symposium (eds. Hopley D., Hopley P., Tamelander J., Done T.). Bali, Indonesia. 2000. Volume Abstracts. P. 21.
13. Wreheide G. et al. Biogeography and taxonomy of the Indo-Pacific reef cave dwelling coralline demosponge *Astrosclera* ‘willeyana’: new data from nuclear internal transcribed spacer sequences // In: Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium, Bali, Indonesia (eds Moosa K. M., Soemodihardjo S., Soegiarto A. et al.), P. 339–345. State Ministry for the Environment, Indonesia. 2002.

Содержание

Раздел 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ

Беленькая С.В., Ельчанинов В.В., Щербаков Д.Н.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ ПРОХИМОЗИНОВ
VICUGNA PACOS И *CAMELUS FERUS* В СИСТЕМЕ *E. COLI*3

Бобрикова Е.Н., Разум К.В., Дмитриенко Е.В.

ПОЛУЧЕНИЕ КАПСУЛИРОВАННЫХ ФОРМ ДОКСОРУБИЦИНА
НА ОСНОВЕ НЕЙЛОНА-66

Боковая О.В., Морозова В.В., Байков И.К., Тикунова Н.В.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЭНДОТОКСИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ
БЕЛКОВ10

Габбасов А.З., Титова Т.Н.

НАБОР ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МИКРОСПОРИИ
(*MICROSPORUM CANIS*) В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ12

Глаголев В.И., Воскресенская Е.Д., Джавахия В.В.

ПОДБОР АГАРИЗОВАННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ
ИНДУЦИРОВАННОГО НЕНАПРАВЛЕННОГО УФ-МУТАГЕНЕЗА
ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТАКРОЛИМУСА15

Елгина А.Ф., Забродская Я.А., Демьянова Е.В., Батарин В.И.,

Лисицкая В.И., Протасов Е.А., Ищенко А.М.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ESCHERICHIA COLI*
BL21 DE3 С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМЕТИОНИНОВОГО ИНТЕРФЕРОНА
АЛЬФА – 2b19

Бабич П.И., Зарубин В.Н.

ПРИНЦИП ЛЕЧЕНИЯ ПУТЁМ УСТРАНЕНИЯ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО
ДЕСИНХРОНОЗА24

Зеленцова Е.А., Яньшолё Л.В., Снытникова О.А., Яньшолё В.В.,

Центалович Ю.П.

МЕТАБОЛОМИКА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ
СУДЕБНОЙ МЕДИЦИНЫ И ДИАГНОСТИКИ27

Климова К.М.

УСТОЙЧИВОСТЬ ШТАММОВ *THERMODESULFOVIBRIO V2* И
DESULFOTOMACULUM BU1-1 К ВЫСОКИМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ НИКЕЛЯ29

Колосова Е.А., Морозов И.В., Щербаков Д.Н.

ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ ФАГОВЫХ ПЕПТИДНЫХ
БИБЛИОТЕК ДЛЯ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ32

Комарова А.О.

РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК –
ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ I В КАЧЕСТВЕ ПРОТОТИПОВ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОТИВОРАКОВОЙ ТЕРАПИИ35

Компанеец И.Ю., Невинский Г.А.

СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОЛИГОСАХАРИДОВ И
ЛИПИДОВ, ПРОЧНО СВЯЗАННЫХ С ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ МОЛОКА
ЧЕЛОВЕКА.....39

Корчагина К.В., Пархоменко Р.Г., Рябчикова Е.И.

ПОВЕДЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ПОКРЫТИЕМ ИЗ МЕЗОПОРИСТОГО
ОКСИДА КРЕМНИЯ В КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СРЕДАХ И ИХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С КЛЕТКАМИ ЛИНИИ MDA-MB-23141

Малахова К.В., Марамохин Э.В.

ОПЫТ ПО ВВЕДЕНИЮ В КУЛЬТУРУ IN VITRO *CORYLUS AVELLANA* (L.)
H. KARST. ДЛЯ ПОСЛЕДУЮЩЕГО КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ.....45

Марамохин Э.В., Малахова К.В.

SCHISANDRA CHINENSIS (TURCZ.) BAILL. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO48

Мистерова А.В., Герасимов А.С.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ,
СОДЕРЖАЩИХ МУТАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА
ТРОМБОЦИТАРНОГО ФАКТОРА РОСТА PDGFB ЧЕЛОВЕКА51

Мифтахов Р.А., Лапа С.А., Чудинов А.В.

МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИМЕРНОЙ ПОДЛОЖКИ
ДЛЯ КОВАЛЕНТНОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ
ПОЛИСАХАРИДНЫХ МИКРОЯЧЕЕК54

Мочалина П.Ю., Серба Е.М.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КОНВЕРСИЯ МИЦЕЛИАЛЬНОЙ БИОМАССЫ
ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОДОБАВОК58

Ножкина О.А., Перфильева А.И., Сидоров А.В.,**Граскова И.А., Сухов Б.Г.**

ИЗУЧЕНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НАНОКОМПОЗИТОВ СЕРЕБРА
И ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ОЗДОРОВЛЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ60

Одинцова Е.С., Тимофеева А.М., Баранова С.В.

ПРИРОДНЫЕ АБЗИМЫ КРОВИ – НОВЫЕ МАРКЕРЫ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ
И АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ66

Охлопкова О.В., Моисеева А.А., Кузнецов В.Е., Худеева К.А.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА СКОРОСТЬ ДОСТИЖЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО ВОЗРАСТА НЕПАРНЫМ ШЕЛКОПРЯДОМ (<i>LYMANTRIA DISPAR</i> L.)	69
--	----

**Пыхтина М.Б., Романов В.П., Мирошниченко С.М.,
Беклемишев А.Б.**

ДИЗАЙН НЕВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ПЕРЕНОСА ДНК В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ	73
---	----

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

БИСПЕЦИФИЧНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ В НОРМЕ И ПРИ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЯХ	76
--	----

Приставка А.А., Ефременко З.А., Неустроев М.Ю.

ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЫСШИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ	78
--	----

Прманова Э.П.

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ РАЗНООБРАЗИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ АЭРОЗОЛЕЙ АТМОСФЕРНОГО ВОЗДУХА	81
---	----

Проценко М.А., Костина Н.Е.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ДЕРЕВОРАЗРУШАЮЩИХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ	84
--	----

Пурвиньш Л.В., Седых С.Е., Невинский Г.А.

ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА: ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, БЕЛКОВЫЙ АНАЛИЗ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ	88
---	----

Ракипова И.Р.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА А В ПИЩЕВОМ ЯЙЦЕ	91
---	----

Рудометов А.П., Щербаков Д.Н., Андреева Н.Б.,**Бакулина А.Ю., Чикаев А.Н., Карпенко Л.И.**

ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ ГЕНОВ ВИЧ-ИММУНОГЕНОВ, С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ БИОСИНТЕЗА КОДИРУЕМЫХ БЕЛКОВ И УПРОЩЕНИЯ СХЕМЫ ИХ ОЧИСТКИ	94
--	----

Русанова О.А., Гонтарь И.П., Емельянова О.И.,**Маслакова Л.А., Парамонова О.В.**

ПРИМЕНЕНИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ КОРЕКЦИИ АНТИТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ У БОЛЬНЫХ АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ	98
---	----

**Севостьянова В.В., Антонова Л.В., Великанова Е.А., Матвеева В.Г.,
Кривкина Е.О., Глушкова Т.В., Миронов А.В., Барбараш Л.С.**

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЙ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЙ ГРАФТ
НА ОСНОВЕ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ
КРОВЕНОСНОГО СОСУДА IN SITU101

Скрипкин С.С., Юнусова А.М., Смирнов А.В., Баттулин Н.Р.

ВЛИЯНИЕ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ CAS9-RNF169 И CAS9-СТП НА CAS9
ИНДУЦИРОВАННУЮ РЕПАРАЦИЮ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК.....105

Спицын М.А., Кузнецова В.Е., Мифтахов Р.А., Чудинов А.В.

СИНТЕЗ НОВЫХ «ЦВИТЕРИОННЫХ» ПЕНТАМЕТИНОВЫХ
ИНДОЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ
ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ107

Старожилова К.В., Колосова Е.А., Щербаков Д.Н.

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА
АСТАКСАНТИНА НА ОСНОВЕ ДРОЖЖЕЙ *PHAFFIA RHODOZYMA*
(*XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*)110

Уткина И.Ю.

СРАВНЕНИЕ ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ
РАЗНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА ПОДОРОЖНИКОВЫЕ.....113

Харченко А.В., Широкова Н.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ЭЛЮЦИИ АЛЬБУМИНА ЧЕЛОВЕКА
ИЗ ГЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ
GLUCONACETOBACTER XYLINUM115

Шаньшин Д.В., Бакулина А.Ю., Щербаков Д.Н.

ПОЛУЧЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ ХИМЕРНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСА ЗИКА
И ИХ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ118

Шершов В.Е., Золотов А.М., Кузнецова В.Е., Чудинов А.В.

НОВЫЕ ДЕЗОКСИУРИДИНТРИФОСФАТЫ
ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫЕ ГЕПТАМЕТИНОВЫМИ
ИНДОЦИАНИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ122

Раздел 2. ВИРУСОЛОГИЯ

**Андреева Н.Б., Щербакова Н.С., Щербаков Д.Н.,
Рудометов А.П., Карпенко Л.И.**

РАСШИРЕНИЕ И ОПИСАНИЕ ПАНЕЛИ ENV-ПСЕВДОВИРУСОВ ВИЧ-1
НА ОСНОВЕ ИЗОЛЯТОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
В СИБИРСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ126

**Баймухаметова А.М., Қалқожаева М.Қ., Сактаганов Н.Т.,
Байсейіт С.Б., Кливлеева Н.Г., Мухтарова К.Г.**

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ ПАВЛОДАРСКОЙ
ОБЛАСТИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ ПЕРИОДЫ 2016–2017 ГГ.130

Бурмакина Г.С., Малоголовкин А.С.

ПОИСК ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ КАЛИЦИВИРУСОВ КРОЛИКОВ132

**Гладышева А.В., Пономарева Е.П., Терновой В.А., Микрюкова Т.П.,
Протопопова Е.В., Швалов А.Н., Коновалова С.Н., Чаусов Е.В., Локтев В.Б.**

АДАПТАЦИЯ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ВЫДЕЛЕННОГО
ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОЗГА, К РАЗЛИЧНЫМ КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ136

Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Дерюшева И.В.

СТАТУС ВПЧ И ЕГО ГЕНОМНАЯ ИНТЕГРАЦИЯ ВЛИЯЕТ
НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ РШМ141

**Қалқожаева М.Қ., Баймухаметова А.М., Амирашева Л.К.,
Шаменова М.Г., Глебова Т.И., Сагатова М.Е.**

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРРИТОРИИ
ВОСТОЧНОГО КАЗАХСТАНА В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2016–2017 ГГ145

Канаева О.И., Романенкова Н.И., Бичурина М.А., Розаева Н.Р.

РОЛЬ ВИРУСОВ КОКСАКИ В1-6 В ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ
ЭНТЕРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ147

**Ковалева Г.В., Никитенко Н.А., Макарова И.В.,
Лысенко А.А., Тухватулин А.И., Андреева Л.Е.,
Логунов Д.Ю., Ненашева В.В., Тарантул В.З.**

ПОДАВЛЕНИЕ ИНФЕКЦИИ ГРИППА В КЛЕТКАХ A549 С ПОМОЩЬЮ
TRIM14 ЧЕЛОВЕКА151

Кривошеина Е.И., Кузнецов А.И., Карташов М.Ю., Микрюкова Т.П.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА КЕМЕРОВО В ИКСОДОВЫХ КЛЕЩАХ,
СОБРАННЫХ В РЕСПУБЛИКЕ КОМИ155

Кузнецов А.И., Кривошеина Е.И., Чуб Е.В., Карташов М.Ю.

ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЗАРАЖЕННОСТИ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С
ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛЮДЕЙ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ159

**Марков А.В., Купрюшкин М.С., Амирханов Р.Н., Гончарова Е.П.,
Марков О.В., Логашенко Е.Б., Абрамова Т.В., Васильева С.В.,
Сильников В.Н., Стеценко Д.А., Пышный Д.В., Зенкова М.А.**

АНТИСМЫСЛОВОЙ ФОСФОРИЛГУАНИДИНОВЫЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИД,
НАПРАВЛЕННЫЙ НА СЕГМЕНТ 2 ВИРУСА ГРИППА А, ПОДАВЛЯЕТ
РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА *IN VITRO*163

Никонова А.А., Глотова Т.И., Глотов А.Г.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА
BOERHAVIA DIFFUSA В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА
 ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА166

**Онгарбаева Н.С., Лукманова Г.В., Байсейіт С.Б.,
Шаменова М.Г., Кливлеева Н.Г.**

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ГРИППА В ПОПУЛЯЦИЯХ СВИНЕЙ
 НА ТЕРРИТОРИИ ВОСТОЧНОГО КАЗАХСТАНА В 2013–2016 ГГ.169

**Онгарбаева Н.С., Амирашева Л.К., Лукманова Г.В.,
Сактаганов Н.Т., Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г.**

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КАЗАХСТАНСКОГО ШТАММА
A/KYZYLORDA/185/15 K РЕМАНТАДИНУ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК MDCK
 И НА КУРИНЫХ ЭМБРИОНАХ171

Онхонова Г.С., Мальцев С.В., Рыжиков А.Б.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 РЕЦЕПТОРНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А173

Полежаева О.А., Щербаков Д.Н.

РАЗРАБОТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ
 СБОРКУ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ МАРБУРГ177

**Садикалиева С.О., Шораева К.А., Шыныбекова Г.О., Бурашев Е.Д.,
Орынбаев М.Б., Султанкулова К.Т.**

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
 ГЕРПЕСВИРУСА ЛОШАДЕЙ 1 И 4 СЕРОТИПОВ.180

Сачивкина Н.П.

ВИРУСЫ ХЕНДРА И НИПАХ183

**Святченко С.В., Дурыманов А.Г., Гончарова Н.И., Колосова Н.П.,
Суслопаров И.М., Епанчинцева А.В., Гудымо А.С., Марченко В.Ю.,
Михеев В.Н., Рыжиков А.Б., Ильичева Т.Н.**

ВИРУСЫ ГРИППА А И В, ЦИРКУЛИРОВАВШИЕ СРЕДИ ЛЮДЕЙ
 В РОССИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2016–2017188

**Соколова А.С., Яровая О.И., Кононова А.А., Зарубаев В.В.,
Салахутдинов Н.Ф.**

ШИРОКИЙ СПЕКТР ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ
 ПРОИЗВОДНЫХ БИЦИКЛИЧЕСКИХ ТЕРПЕНОИДОВ191

**Ткачёва А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф.,
Коваль О.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А.**

АНАЛИЗ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОГО
 ШТАММА ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО
 СЕКРЕТИРУЕМЫЙ ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК ГМ-КСФ/ЛАКТАПТИН195

Янжиева Д.В., Титов И.А., Сальников Н.И.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА КОНТАГИОЗНОЙ ЭКТИМЫ,
ВЫДЕЛЕННОГО В 2015 ГОДУ В РЕСПУБЛИКЕ ТЫВА197

Раздел 3. МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ**Антонова Д.В., Плешкан В.В.**

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОМОТОРОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ
ПЕРИОДЕ КУЛЬТИВАЦИИ КЛЕТОК201

Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютов А.З.,**Гаврилова Е.В., Максютов Р.А.**

РАЗРАБОТКА ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕЛАНОМЫ205

Беловежец Т.Н.

РАЗРАБОТКА И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ
АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ К CD20208

**Боробова Е.А., Антонен Д.В., Старостина Е.В., Орешкова С.Ф.,
Щербаков Д.Н., Смирнова О.Ю., Бажан С.И., Ильичев А.А., Карпенко Л.И.,
Даниленко Е.Д., Гамалей С.Г., Усова С.В., Богрянцева М.П.**

ТЕРАПЕВТИЧЕСКАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ МЕЛАНОМЫ.....211

Варламова Е.Г., Гольтяев М.В.

КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ мРНК ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ
СЕЛЕНОЦИСТЕИН- СОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ SELV, SELW И TGR
В НОРМАЛЬНЫХ И РАКОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ СЕМЕННИКОВ
И ПРОСТАТЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ214

**Глаголева А.Ю., Шмаков Н.А., Шоева О.Ю., Васильев Г.В.,
Шацкая Н.В., Бернер А., Афонников Д.А., Хлесткина Е.К.**

ИДЕНТИФИЦИЯ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В СИНТЕЗ
МЕЛАНИН-ПОДОБНЫХ ПИГМЕНТОВ ЗЛАКОВЫХ РАСТЕНИЙ217

Дерюшева И.В., Родионов Е.О., Цыганов М.М., Ибрагимова М.К.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ АДЪЮВАНТНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ
ПРИ ЛЕЧЕНИИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО219

Дюдеева Е.С., Павлова А.С.

АНАЛИЗ НЕЗАРЯЖЕННЫХ АНАЛОГОВ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ
МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА223

Дронова Т.А., Паталяк С.В.

СВЯЗЬ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРОВ ФАКТОРОВ РОСТА EGFR,
TGF- β 1 И VEGFR2 И ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ИХ ГЕНОВ
С ЭФФЕКТИВНОСТЬЮ ТЕРАПИИ ТАМОКСИФЕНОМ
У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ226

**Жоров М.И., Кабилова Т.О., Власов В.В.,
Зенкова М.А., Черноловская Е.Л.**

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АНТИПРОЛЕФИРАТИВНОЙ
И ИНТЕРФЕРОН-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ КОРОТКОЙ
ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ РНК.....230

**Журавлев Е.С., Степанов Г.А., Шендер В.О., Арапиди Г.П.,
Ануфриева К.С., Нуштаева А.А., Балахонова Е.А., Можаяева Е.В.,
Шах Махмуд Р., Маланин С.Ю., Григорьева Т.В., Говорун В.М.,
Семенов Д.В., Рихтер В.А.**

ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
АНАЛОГОВ МАЛЫХ ЯДЕРНЫХ И МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК
В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА233

Ильичев И.В.

КАРТИРОВАНИЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ЭПИТОПОВ
ОСНОВНОГО ИММУНОГЕННОГО БЕЛКА Р35 ОРТОПОКСВИРУСОВ237

Карташев А.А.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕСТНЫХ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS*
THERMOPHILUS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФРАКРАСНОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ С ПРЕОБРАЗОВАНИЕМ ФУРЬЕ239

Кизилова В.А.

САМООГРАНИЧЕННЫЕ КОМПЛЕКСЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ –
ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ГЕН-НАПРАВЛЕННЫЕ АГЕНТЫ. ФИЗИКО-
ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ.....243

Колобков Д.С., Хаджиева М.Б.

IN SILICO АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
ПРИ ПРОЛАПСЕ ТАЗОВЫХ ОРГАНОВ246

Котова М.В., Трифонова Н.В.

ИЗУЧЕНИЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-1 ЧЕЛОВЕКА
В КАЧЕСТВЕ ПЕРЕНОСЧИКА ПЛАЗМИДНЫХ ДНК.....249

Кургина Т.А., Алемасова Е.Э., Науменко К.Н.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ Y-БОКС СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА 1
И ПОЛИ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛИМЕРАЗЫ 1253

Лукьяничикова Н.В., Петрусёва И.О., Лаврик О.И.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ УДАЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК СИСТЕМОЙ ЭРН
ОПРЕДЕЛЯЕТСЯ ИХ ВЗАИМНЫМ РАСПОЛОЖЕНИЕМ В КЛАСТЕРАХ256

Мамонтова Е.М., Захаренко А.Л.

РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК ТИРОЗИЛ-
ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ1 И ЕГО ПРИРОДНОГО МУТАНТА SCAN1
В КАЧЕСТВЕ ПРОТОТИПОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....258

**Марченков А.М., Петрова Д.П., Морозов А.А.,
Бондарь А.А., Грачев М.А.**

МУЛЬТИПЛИЦИРОВАННЫЕ ГЕНЫ ТРАНСПОРТА
КРЕМНИЕВОЙ КИСЛОТЫ (*SIT*) У ДИАТОМОВОЙ ВОДОРОСЛИ
SYNEDRA ULNA SUBSP. *DANIKA*262

Михайлова Ю.В.

К НОВЫМ МОДЕЛЯМ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ: ОБОГАЩЕНИЕ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ДРЁМЫ ДВУДОМНОЙ *MELANDRIUM*
DIOICUM (SILENEAE, CARYOPHYLLACEAE)266

Миракбарова З.М., Турдикулова Ш.У., Адилев Б.Р.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПЦР ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ДЕЛЕЦИИ
c.2235_2249del В ГЕНЕ EGFR В ПЛАЗМЕ БОЛЬНЫХ
НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО270

Небова Ю.А., Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Литвяков Н.В.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СОМАТО-СТВОЛОВОГО ПЕРЕХОДА В ОПУХОЛИ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ
ХИМИОТЕРАПИИ273

Полякова М.В.

ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕДИЦИНА ВО ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ: ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПОЛОВЫХ
КЛЕТОК И ГАМЕТ ИЗ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК278

Порываева А.В., Купрюшкин М.С., Зайцева Э.Г., Дмитриенко Е.В.

НОВЫЙ ПОДХОД К ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ
КНИ-ТРАНЗИСТОРА ДЛЯ БЕЗМЕТОЧНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ КОРОТКИХ РНК282

Ромашова К.С., Лапа С.А., Чудинов А.В.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
КОМБИНАТОРНЫХ ДНК-БИБЛИОТЕК С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЦР
В ОБРАТНОЙ ЭМУЛЬСИИ285

Седых С.Е., Пурвиньш Л.В., Соболева С.Е., Невинский Г.А.

ЭКЗОСОМЫ И ДРУГИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ БЕЛКОВЫЕ
КОМПЛЕКСЫ МОЛОКА: СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ289

Смагина А.С.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ НК КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ БЕЛКА VAV1291

**Смирнова А.М., Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И.,
Елисафенко Е.А., Закиян С.М.**

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ АКТИВАЦИИ ФАКТОРА,
ИНДУЦИРУЕМОГО ГИПОКСИЕЙ, В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА НА АНГИОГЕННЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ294

**Старчевская М.Е., Непомнящих Т.С., Якубицкий С.Н.,
Таранов О.С., Антонен Д.В., Щелкунов С.Н.**

ИЗУЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ИНТЕРЛЕЙКИН-1-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА ВИРУСА ОСПЫ КОРОВ IN VITRO И IN VIVO	296
--	-----

Травина А.О., Ильичева Н.В.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ РЕКОМБИНАНТНОГО ДОМЕНА ТЕЛОМЕР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА TRF2, НЕОБХОДИМОГО ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТЕЛОМЕР С ЯДЕРНОЙ МЕМБРАНОЙ	298
--	-----

Трифорова Н.В.

ВЛИЯНИЕ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-1 В КОМПЛЕКСЕ С ЭСТРОНОМ НА БИОСИНТЕЗ ДНК В КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС	300
--	-----

Флоринская А.В., Иванов А.С.

БЕЛКОВАЯ ИНТЕРАКТОМИКА: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	304
--	-----

Хаджиева М.Б.

РОЛЬ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ МИНЕРАЛЬНОЙ ПЛОТНОСТИ КОСТНОЙ ТКАНИ В РАЗВИТИИ ПРОЛАПСА ТАЗОВЫХ ОРГАНОВ У ЖЕНЩИН	308
--	-----

Цыганов М.М., Ибрагимова М.К., Дерюшева И.В.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА <i>BRCA1</i> В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ НЕОАДЪЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ	311
---	-----

Яньшоле В.В., Яньшоле Л.В., Снытникова О.А., Центалович Ю.П.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ МЕТАБОЛОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ ГЛАЗА ЧЕЛОВЕКА	315
---	-----

Яхненко А.С., Ицкович В.Б.

ИЗУЧЕНИЕ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ДВУХ ФРАГМЕНТОВ ГЕНА <i>COX1</i> ДЛЯ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ БАЙКАЛЬСКИХ ГУБОК СЕМЕЙСТВ <i>LUBOMIRSKIIDAE</i> И <i>SPONGILLIDAE</i>	318
---	-----

Научное издание

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

Сборник тезисов

Верстка *О.А. Тенекеджи*

Подписано в печать 10.10.2017 г.
Формат 60x84/16. Уч.-изд. л. 20,75. Усл. печ. л. 19,3.
Тираж 150 экз. Заказ № 213.
Издательско-полиграфический центр НГУ.
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.

ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

Площадка открытых коммуникаций OpenBio – комплекс мероприятий, посвященных коммерциализации идей и развитию бизнеса в сфере наук о жизни:



ФОРУМ ДЛЯ БИЗНЕСА, НАУКИ, ВЛАСТИ И ИНФРАСТРУКТУРЫ



**НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ,
ВИРУСОЛОГОВ И БИОТЕХНОЛОГОВ**



**ВЫСТАВКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И
БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ КОМПАНИЙ**



**НАУКА БЕЗ ГРАНИЦ:
ДЕТСКИЙ ФОРУМ, ART SCIENCE, ЭСТЕТИКА МИКРОМИРА**

ISBN 978-5-4437-0687-0



9 785443 706870



www.openbio.ru