



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР»



ИННОВАЦИОННЫЙ
ЦЕНТР КОЛЬЦОВО



НАУКОГРАД
КОЛЬЦОВО



БИОТЕХНОПАРК
КОЛЬЦОВО



СИБФАРМ



KOLTSOVO / 2018

OPEN
BIO

ПЛОЩАДКА ОТКРЫТЫХ КОММУНИКАЦИЙ OPENBIO

СБОРНИК

ТЕЗИСОВ

В МЕЖДУНАРОДНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ

НАУКОГРАД КОЛЬЦОВО - 2018



N* Новосибирский
государственный
университет
*НАСТОЯЩАЯ НАУКА



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

Сборник тезисов

Новосибирск
Наукоград Кольцово
2018

УДК 577.2:62.01:578+(001)

ББК 28.07:30.16:28.4

М 431

М 431 V Международная конференция молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов — 2018 : Сб. тез. / АНО «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск : ИПЦ НГУ, 2018. — 426 с.

ISBN 978-5-4437-0821-8

Сборник тезисов составлен на основе материалов, присланных российскими и иностранными учеными в оргкомитет Международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов, проходящей в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2018.

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 978-5-4437-0821-8

© АНО «Инновационный центр
Кольцово», 2018

РАЗДЕЛ 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВ YKUJ И TBI В КАЧЕСТВЕ
ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВИЧ-ИММУНОГЕНОВ*****USE OF YKUJ AND TBI PROTEINS AS A PLATFORM
FOR THE DEVELOPMENT OF HIV-IMMUNOGENES**

Н. Б. Андреева¹, А. П. Рудометов¹, А. Ю. Бакулина²,
Л. И. Карпенко¹, Д. Н. Щербakov¹

¹ *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора*

² *Новосибирский государственный университет*

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

¹ *FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*

² *Novosibirsk State University, Russia*

Аннотация

Активно развивающимся направлением в области разработки вакцины против ВИЧ-1 является разработка иммуногенов, направленных на индукцию антител, способных нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1. Одной из консервативных областей ВИЧ-1 с которой связываются широконейтрализующие антитела является мембрано-проксимальная наружная область, однако добиться образования нейтрализующих антител к данному региону при иммунизации удается крайне редко. В данной работе представлены результаты использования белков YkuJ и TBI в качестве платформы для получения ряда иммуногенов (рекомбинантных белков), направленных на индукцию нейтрализующих антител к MPER региону ВИЧ-1.

© Н. Б. Андреева, А. П. Рудометов, А. Ю. Бакулина, Л. И. Карпенко, Д. Н. Щербakov, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00314.

Abstract

An actively developing field in the development of the vaccine against HIV-1 is the development of immunogens aimed at inducing antibodies capable of neutralizing a wide spectrum of HIV-1 isolates (bNAbs). One conservative region of HIV-1, to which bNAbs bind, is the membrane-proximal external region (MPER), which includes a number of linear epitopes of broadly neutralizing antibodies 10E8, 4E10 and 2F5, but it is extremely rare to achieve such antibodies in immunization. In this paper, the use of YkuJ and TBI proteins as a platform for the production of a number of immunogens (recombinant proteins) aimed at inducing neutralizing antibodies to the MPER region of HIV-1 is discussed.

Одной из фундаментальных задач в области разработки вакцины против ВИЧ-инфекции является конструирование иммуногенов и разработка схемы иммунизации, результатом которых будет наработка в организме антител, способных нейтрализовать широкое разнообразие изолятов ВИЧ-1. Широконейтрализующие антитела (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) нацелены на несколько консервативных сайтов уязвимости на поверхности гликопротеина оболочки ВИЧ-1 [1]. Одной из таких областей ВИЧ-1 является мембрано-проксимальная наружная область (membrane proximal external region, MPER), которая состоит из 22 аминокислотных остатков, расположенных на С-конце эктодомена gp41 [2]. В данной области находится ряд линейных эпитопов, узнаваемых широконейтрализующими антителами 10E8, 4E10 и 2F5, однако добиться образования подобных антител при иммунизации удастся крайне редко [3]. Одной из проблем в индукции нейтрализующих антител к MPER является конформационная подвижность субъединицы gp41, являющаяся следствием структурных изменений при слиянии вирусной и клеточной мембран. Еще одной из проблем при разработке вакцины на основе MPER является необходимость избирательного воздействия на иммунную систему с целью концентрации гуморального иммунного ответа на область MPER и выработке соответствующих нейтрализующих антител. Для этого может быть полезна система прайм-бустерной иммунизации, когда используются разные каркасные белки, но несущие один и тот же целевой белковый антиген.

Целью данного исследования является получение и исследование свойств ряда иммуногенов на основе белков YkuJ и TBI, направленных на индукцию нейтрализующих антител к MPER региону ВИЧ-1.

Ранее на основе белков YkuJ и TBI были получены химерные белки TBI_tag и YkuJ-MPER [4, 5]. При проектировании TBI_tag и YkuJ-MPER области, кодирующие эпитопы bNAbs, были фланкированы уникальными сайтами рестрикции для клонирования гена в составе плазмиды и возможности замены эпитопов.

Путем последовательной встройки олигонуклеотидных дуплексов, кодирующих область MPER, на основе TBI были получены две генетические конструкции, кодирующие один и два участка MPER ВИЧ-1. На основе последовательности, кодирующей YkuJ-MPER, были получены пять различных генетических конструкций с варьируемыми эпитопами MPER. Эти модификации необходимы для создания на основе белков TBI_tag и YkuJ-MPER панели экспериментальных иммуногенов, способных обеспечить при прайм-бустерной иммунизации созревание нейтрализующих антител к MPER региону ВИЧ-1.

Гены химерных белков были клонированы в составе плазмидного вектора pET21a по сайтам рестрикции NdeI и XhoI в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 а.о. гистидина. Нуклеотидная последовательность всех конструкций была подтверждена секвенированием.

Полученными плазидами pET-YkuJ-MPER-1-5 и pET-MPER-TBI-1-2 были трансформированы компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) для наработки рекомбинантных белков. Белки YkuJ-MPER-1-5 и MPER-TBI были очищены с помощью металл-хелатной хроматографии для анализа их структуры, антигенных и иммуногенных свойств. Степень очистки белков оценивали с помощью электрофореза в 15%-м SDS-PAGE с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250. Дополнительную очистку белков и их рефолдинг проводили с помощью диализа против буферов со снижающейся концентрацией мочевины.

Для исследования антигенных свойств белков YkuJ-MPER и MPER-TBI, был проведен дот-блот анализ с использованием bNAbs 10E8, 4E10, 2F5. В качестве контроля использовали TBI_tag, который не содержит эпитопы данных антител. Проведенный дот-блот анализ подтвердил, что YkuJ-MPER и MPER-TBI могут специфически распознаваться bNAbs 10E8, 4E10, 2F5. Было установлено, что при одинаковой концентрации белка МКА эффективнее взаимодействуют с YkuJ-MPER, чем с MPER-TBI, что может свидетельствовать о более корректной презентации данных эпитопов в составе YkuJ-MPER.

Определение вторичной структуры антигенов YkuJ-MPER и MPER-TBI проводили с помощью метода кругового дихроизма (КД).

Для анализа иммуногенности белков была проведена иммунизация кроликов очищенными препаратами YkuJ-MPER-1-5 и MPER-TBI-1-2. Иммуногенность рекомбинантных белков определяли по специфической активности полученных сывороток в ИФА. Далее был проведен перекрестный ИФА, для этого сыворотки из группы животных, иммунизированных MPER-TBI, анализировали на способность взаимодействовать с YkuJ-MPER и наоборот.

Таким образом, в ходе работы получены генетические конструкции, кодирующие рекомбинантные белки YkuJ-MPER-1-5 и MPER-TBI-1-2, а также соответствующие продуценты рекомбинантных белков. Разработаны протоколы очистки с помощью металл-хелатной хроматографии и протоколы диализа. Дот-блот анализ показал, что YkuJ-MPER и MPER-TBI могут специфически распознаваться bNAbs 10E8, 4E10, 2F5. Анализ специфической активности полученных сывороток показал, что в организме кроликов, иммунизированных как YkuJ-MPER, так и MPER-TBI, формируются специфические антитела. Перекрестные проверки иммуногенных свойств YkuJ-MPER и MPER-TBI показали, что обе конструкции способны вызывать анти-MPER антитела. При этом YkuJ более эффективно презентует MPER, чем TBI.

Литература

1. Щербаков Д. Н., Бакулина А. Ю., Карпенко Л. И., Ильичев А. А. Антитела, нейтрализующие широкий спектр изолятов ВИЧ-1, -новая грань иммунной системы // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). — 2015. — Т. 7. — №. 4 (27). — С. 14–25.
2. Montero M., van Houten N. E., Wang X., Scott J. K. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design // *Microbiology and molecular biology reviews*. — 2008. — V. 72. — №. 1. — P. 54–84.
3. Molinos-Albert L. M., Clotett B., Blanco J., Carrillo J. Immunologic insights on the Membrane Proximal external Region: A Major Human immunodeficiency virus Type-1 vaccine Target // *Frontiers in immunology*. — 2017. — V. 8. — P. 1–12.
4. Андреева Н. Б., Рудометов А. П., Бакулина А. Ю., Щербаков Д. Н. Изучение иммуногенности химерного белка, включающего эпитопы антител, нейтрализующих широкий спектр первичных изолятов ВИЧ-1 // *Международный научно-исследовательский журнал*. — 2017. — № 08 (62). — Часть 2. — С. 6–10.
5. Рудометов А. П., Андреева Н. Б., Чикаев А. Н., Щербакова Н. С., Каплина О. Н., Карпенко Л. И. Антигенные свойства искусственного полиэпитопного ВИЧ-иммуногена // *Сибирский научный медицинский журнал*. — 2018. — Т. 8. — № 4. — С. 37–43.

**ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ
ЭНДОКАННАБИНОИДА N-АРАХИДОНОИЛДОФАМИНА
НА СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЭКТОПИЧЕСКОГО
И ЭУТОПИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИЯ**

**ACTION OF N-ARACHIDONOYL DOPAMINE ON THE VIABILITY
AND PROLIFERATION OF STROMAL CELLS
FROM EUTOPIC AND ECTOPIC ENDOMETRIUM**

А. М. Ашба^{1,2}, М. Н. Юшина¹,
И. А. Федорова-Гоголина¹, М. Ю. Бобров^{1,2}

¹ *ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр
акушерства, гинекологии и перинатологии имени ак. В. И. Кулакова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации*

² *ФГБУН «Институт биоорганической химии им. ак.
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова» Российской академии наук*

A. M. Ashba^{1,2}, M. N. Yushina¹, I. A. Fedorova¹, M. Yu. Bobrov^{1,2}

¹ *The National Medical Research Center of Obstetrics,
Gynecology and Perinatology*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry*

E-mail: alyafonya@mail.ru

Аннотация

Эндометриоз характеризуется формированием очагов эндометриальной ткани вне полости матки. На сегодняшний день эффективная медикаментозная терапия эндометриоза не разработана, поэтому хирургическая резекция поражений при распространенном эндометриозе является наиболее эффективным способом лечения. В последние годы эндоканнабиноидная система рассматривается как перспективная мишень терапевтического воздействия на опухолевые клетки, однако ее роль в патогенезе эндометриоза остается мало изученной. В данной работе было проведено сравнительное исследование цитотоксического действия эндоканнабиноида N-арахидоноилдофамина (AA-DA) на культивируемые стромальные клетки эктопического и эутопического эндометрия.

Abstract

Endometriosis is characterized by the formation of foci of endometrial tissue outside the uterine cavity. To date, there is no effective medical therapy of endometriosis, so sur-

gical resection of lesions is the most effective treatment. In the last years, the endocannabinoid system is considered as a promising target of therapeutic effects on tumor cells, but the participation of the endocannabinoid system in the pathogenesis of endometriosis remains poorly understood. In this work, a comparative study of the cytotoxic effect of endocannabinoid N-arachidonoyldopamine (AA-DA) in cultured stromal cells of ectopic and eutopic endometrium was conducted.

Эндометриоз — неопластическое заболевание, характеризующееся наличием эктопических участков эндометрия за пределами матки. Оно встречается у 6–10 % женщин репродуктивного возраста, причем его патофизиология остается невыясненной. Известно, что каннабиноидно-ванилоидная система вовлечена в развитие болевого синдрома при эндометриозе, но влияние этой системы на пролиферацию клеток эндометрия практически не изучено. Цель — работы определение влияния эндоканнабиноида N-арахидоноилдофамина (AA-DA) — лиганда одновременно каннабиноидных и ванилоидных рецепторов — на пролиферацию и гибель культивируемых стромальных клеток эутопического и эктопического эндометрия.

Эксперименты проводили на культивируемых стромальных клетках эутопического (в норме выстилающего полость матки) и эктопического эндометрия, полученных от 15 пациенток под контролем Этического комитета; плотность — 50–100 тыс. клеток/см². Цитотоксичность и пролиферацию оценивали с помощью МТТ-теста и анализа стадий клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии. Механизмы действия изучали с помощью антагонистов рецепторов CB1, CB2, TRPV1, антиоксидантов и ингибитора NO-синтазы, путь клеточной гибели — с помощью панкаспазного ингибитора, флуоресцентных субстратов каспаз 3 и 9 и окраски аннексин-пропидиом. АФК детектировали с помощью флуоресцентного зонда DCFH, мембранный потенциал митохондрий — с помощью зонда TMRE.

AA-DA был цитотоксичен для клеток эутопического и эктопического эндометрия с LC50 15±1 мкМ и 2±1 мкМ, соответственно. В концентрациях 0.078–0.625 мкМ AA-DA стимулировал пролиферацию клеток эутопического эндометрия, однако не влиял на пролиферацию клеток эктопического эндометрия. Цитотоксическое действие AA-DA подавлялось блокатором CB1, пан-каспазным ингибитором, N-ацетилцистеином и аскорбиновой кислотой, а стимуляция пролиферации — блокатором CB2. Токсичные концентрации AA-DA вызывали активацию каспаз 3 и 9, накопление активных форм кислорода и падение мембранного потенциала митохондрий, что указывает на гибель клеток по внутреннему пути апоптоза.

Таким образом, N-арахидоноилдофамин в низких концентрациях стимулирует пролиферацию стромальных клеток эутопического эндометрия за

счет активации рецептора CB2, в высоких концентрациях индуцирует апоптоз по внутреннему пути активации в стромальных клетках эктопического эндометрия за счет активации рецептора CB1. Данное обстоятельство, наряду с отсутствием пролиферативного эффекта в низких дозах для клеток эктопического эндометрия, позволяет рассматривать эндоканнабиноидную систему как перспективную мишень для разработки новых фармакологических подходов для контроля за прогрессированием эндометриoidных гетеротопий.

БИОРИТМЫ И ПРИНЦИП РИТМИЧНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

BIORITHMS AND THE PRINCIPLE OF RHYTHMICITY OF BIOLOGICAL PROCESSES

П. И. Бабич, В. Н. Зарубин

ООО «Сибирский инновационный центр»

P. I. Babich, V. N. Zarubin

LLC "Siberian innovation center", Russia

E-mail: sicenter@bk.ru

Аннотация

С позиции хронобиологического подхода и термодинамического анализа процессов, происходящих в биологических системах, дано определение биопроцесса и его характеристики — биоритма. Сформулирован принцип ритмичности и принцип взаимной когерентности в биологических системах. Разработан метод лечения путём ресинхронизации биоритмов организма и аппарат для его реализации.

Abstract

From the standpoint of the chronobiological approach and the thermodynamic analysis of the processes taking place in biological systems, a definition of the bioprocess and its characteristics, biorhythm, is given. The principle of rhythm and the principle of mutual coherence in biological systems are formulated. A method of treatment by resynchronization of body biorhythms and an apparatus for its realization have been developed.

Актуальность исследований в области хронобиологии подтверждается созданием при РАМН проблемной комиссии «Хронобиология и хрономедицина» для решения вопросов, связанных с возникновением и лечением десинхронозов. В начале 21-го века наблюдается значительный прогресс в направлении исследования биоритмов организма. Они обнаружены на всех уровнях организации организма: молекулярном, клеточном, тканевом, органном и организменном. В результате термодинамического анализа процессов, происходящих в биологических системах, установлена природа биоритмов и дано определения хронома. **Хроном** объединяет всю совокупность биоритмов в организме и представляет собой комплексную многоу-

ровневую иерархическую мульти частотную синхронизированную автоколебательную систему в структуре организма, синхронизованную во времени с геофизическими ритмами [1]. В 2017г. три учёных из США получили Нобелевскую премию в области биологии и медицины за открытие гена и белка *period*. Концентрация белка колеблется с периодичностью 24 часа, и представляет собой биохимический осциллятор на молекулярном уровне, который синхронизирует биоритмы организма с циркадным (суточным) ритмом.

Все биопроцессы в живых организмах представляют собой когерентные непрерывные биохимические реакции последовательностей метаболических циклов, содержащие чередующиеся процессы анаболизма — синтеза веществ, и катаболизма — расщепления веществ. Эти процессы синтеза и расщепления сопровождаются соответственно фазами потребления и выделения энергии, которые с точки зрения биофизики представляют собой когерентные непрерывные термодинамические колебания. Следовательно, в клетках происходит два вида периодических когерентных колебаний: колебаний концентрации веществ и энергетических колебаний. Аналогично происходят групповые когерентные биохимические и термодинамические колебания на уровне ткани, органов, систем и организмов в целом.

Таким образом, **биопроцесс** это непрерывное чередование фаз взаимосогласованных когерентных химико-физических колебательных процессов синтеза и расщепления веществ, протекающих в клетках. Из этого определения следует, что понятие **биоритм**, в этом случае, является характеристикой биопроцесса и означает чередование циклов синтез — расщепление веществ в клетках с определённой частотой.

Исходя из выше изложенного, сформулируем следующие принципы: принцип ритмичности и принцип взаимной когерентности в биологических системах. Принцип ритмичности означает, что все биологические процессы, протекающие в живых организмах, имеют свои биоритмы (частоты), и управлять процессами можно путём воздействия на их биоритмы регулируя частоту.

Принцип взаимной когерентности означает взаимную согласованность во времени когерентных колебательных процессов химической и физической природы, протекающих в живых организмах. В этом и заключается механизм химико-физического взаимодействия, лежащий в основе функционирования биосистем. Из этого следует, что воздействовать на биоритмы можно как химическими (фармакотерапия), так и физическими (физиотерапия) способами.

При заболевании в организме происходит нарушение обменных процессов, которое сопровождается отклонением их биоритмов от нормы —

патологическим десинхронозом (ПД). В настоящее время лечение заболеваний (устранения ПД) происходит в основном методами фармакотерапии. В результате обычной медикаментозной терапии или хронотерапии (хронобиотики) в больной ткани восстанавливаются нарушенные обменные процессы, и согласно принципу взаимной когерентности происходит устранение ПД. Однако такой подход не гарантирует достаточную эффективность и безопасность лечения из-за побочного действия лекарственных препаратов.

Для управления биоритмами физическим способом в компании разработан и запатентован метод ресинхронизирующей физиотерапии (РФТ) [2, 3]. Метод предназначен для лечения широкого спектра заболеваний путем коррекции отклонений в биоритмах больного организма соответствующей частотой ЭМП. Метод реализован на базе разработанного аппаратно-программного комплекса с функцией хронотерапии — хронокорректора биоритмов (ХКБ) организма [4]. ХКБ охватывает лечением все ткани и органы, биоритмы которых попадают в диапазон его рабочих частот. На аппарат РФТ получено регистрационное удостоверение МЗ РФ. В настоящее время на аппарате отрабатывается технология лечения заболеваний ЖКТ.

Литература

1. Зарубин В. Н. Управление функциональным состоянием организма путём воздействия на его хроном // XXVI Международная мультидисциплинарная конференция «Актуальные проблемы науки XXI века», Направление «Биологические науки», г. Москва: Сб. статей. — М.: Международная исследовательская организация «Cognitio», 2017. с. 6–10.
2. Зарубин В. Н. Метод ресинхронизирующей физиотерапии // IX Международная научно-практическая конференция «Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации». Секция «Медицинские науки»: Сб. статей. Ч. 1. — Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2018. с. 166–168.
3. Зарубин В. Н. Способ терапевтического воздействия низкочастотным импульсным ЭМП. // Патент РФ на изобретение № 2616330.
4. Зарубин В. Н., Семин М. М. Магнитоимпульсный низкочастотный терапевтический аппарат. // Патент РФ на полезную модель № 120878.

**ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ СР БАКТЕРИОФАГА
MS2 В РАСТИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ
НА МОДЕЛИ *NICOTIANA TABACUM****

**MS2 BACTERIOPHAGE COAT PROTEIN (CP) EXPRESSION
IN *NICOTIANA TABACUM* AS A MODEL OF A PLANT
EXPRESSION SYSTEM**

Д. О. Байрамова^{1,2}, М. А. Томилин^{1,2}, И. В. Жирнов¹, Е. А. Филипенко¹,
С. В. Герасимова¹, А. В. Кочетов^{1,2}

¹ *Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

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

D. O. Bayramova^{1,2*}, M. A. Tomilin^{1,2}, I. V. Zhynov¹,
E. A. Filipenko¹, S. V. Gerasimova¹, A. V. Kochetov^{1,2}

¹ *The Federal Research Center of Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences Institute
of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

E-mail: bayramova.daria@gmail.com

Аннотация

Белок оболочки вируса, способный самопроизвольно образовывать капсид, может использоваться для создания вирусоподобной частицы (virus-like particle, VLP), состоящей из оболочки — капсида вируса — и содержимого, представленного ДНК или РНК, белком, лекарственной молекулой, пептидом-эпитопом. Такие химерные структуры могут использоваться для доставки биологически активных молекул в организм, они широко применяются при создании вакцин.

Целью настоящей работы является экспрессия белка оболочки бактериофага MS2 в растительной системе на модели *Nicotiana tabacum*.

Abstract

Virus coat protein, which is capable of self-assembling with formation of a capsid, can be applied for virus-like particle (VLP) production. VLP consists of a virus capsid as an

© Д. О. Байрамова, М. А. Томилин, И. В. Жирнов, Е. А. Филипенко, С. В. Герасимова, А. В. Кочетов, 2018.

* Работа поддержана бюджетным проектом 0324-2018-0018.

envelope and a molecule of DNA, RNA, a protein, a drug or an epitope peptide as a filling. Thus, biologically active molecules, including those which induce immune response, can be delivered to a target in an organism.

We aim to express MS2 bacteriophage coat protein in *Nicotiana tabacum* which is an example of a plant expression system.

Белок оболочки (coat protein, CP) вируса *E. coli* MS2 обладает способностью к самопроизвольному образованию капсидоподобных частиц (Fu *et al.*, 2015), поэтому представляет интерес как белок, из которого мог бы собратся капсид для вирусоподобной частицы. Геном MS2 обладает чрезвычайно малым размером в примерно 3500 нуклеотидов (Virus Taxonomy, 2011) (белок оболочки — 393 н.), сам вирус хорошо изучен, поэтому CP является привлекательным объектом для исследования возможности его экспрессии в чужеродных системах.

Растения позволяют производить много продукта при небольших по сравнению с другими экспрессионными системами (например, насекомые, млекопитающие, бактерии) затратах; мы выбрали в качестве модельной системы табак обыкновенный, или виргинский. Цель настоящей работы — стабильная экспрессия белка оболочки бактериофага MS2 в растительной экспрессионной системе на модели *Nicotiana tabacum*, сорт SR1.

Для осуществления цели мы установили такие этапы работы:

- 1) создание генетических конструкций на основе бинарных плазмидных векторов;
- 2) получение стоков агробактерий, несущих плазмиды-конструкции;
- 3) получение посредством агробактериальной трансформации линии *N. tabacum*, SR 1, стабильно экспрессирующей целевой ген;
- 4) анализ полученной линии *N. tabacum* на наличие генетической встройки, измерение уровня экспрессии целевого гена в случае положительного результата.

Бактериофаг MS2 из коллекции ATCC (15597-B1, Великобритания) был наработан в *E. coli* штамма ER2738 на чашках с двойным слоем агар. РНК фага выделили при помощи препарата Trizol и повели обратную транскрипцию, используя реактив iScript компании BIO-RAD, получив кДНК MS2.

Последовательность гена CP была наработана с кДНК MS2 методом ПЦР с высокоточной полимеразой, во фланкирующие последовательности гена были внесены сайты рестрикции, по которым последовательность гена была перенесена в промежуточный вектор pJet1.2 (Thermo Scientific). Из pJet1.2 последовательность CP была клонирована в промежуточный вектор pd35S-Nos-AB-M (A. Himmelbach *et al.*, 2007), в котором имелись двойной промотор CaMV35S и терминатор гена нопалинсинтазы (NOS) для целевого

гена. Из pd35S-Nos-AB-M_CP экспрессионная кассета 2x35S-CP-NOS методом рестрикции-лигирования по 3'-концам была перенесена в бинарный вектор p6N (DNA-Cloning-Service Hamburg, Germany), имеющий селективные маркеры в виде устойчивости к антибиотикам спектиномицину/стрептомицину в *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens* и гигромицину в растениях.

Структура всех генетических конструкций — pJet1.2_CP, pd35S-Nos-AB-M_CP, p6N_CP — была по мере их получения подтверждена рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Химически компетентные клетки *A. tumefaciens* штамма AGL1 (любезно предоставлен Йохеном Кумленом, Гатерслебен, Германия) были трансформированы полученной конструкцией p6N_CP методом замораживания-оттаивания, наработаны и сохранены в виде смеси культуры с глицерином, хранящейся при -80 °C.

Листовые экспланты стерильных растений *Nicotiana tabacum* линии SR1 были трансформированы конструкцией p6N_CP методом агробактериальной трансформации (Deblaere *et al.*, 1987). Мы получили первые униполярные структуры-производные каллусов, состоящие из стебля и листьев.

Предстоит получить растения-трансформанты поколений T0 и T1, подтвердить наличие генетической встройки методом ПЦР. Уровень экспрессии гена CP будет измерен с помощью RT-PCR.

Литература

- 1) Fu Y. *et al.* A novel delivery platform based on Bacteriophage MS2 virus-like particles // Virus Research. — 2016. — V. 211. — P. 9–16;
- 2) Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Andrew M. Q. King *et al.* — Elsevier, 2011;
- 3) Himmelbach A. *et al.* A Set of Modular Binary Vectors for Transformation of Cereals // Plant Physiology. — 2007. — V. 145. — P. 1192–1200;
- 4) Deblaere R. *et al.* Vectors for cloning in plant cells // Meth. Enzymol. 1987. V. 153. P. 277–292.

ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ДЕТЕКТИРУЕМОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ БИОСЕНСОРом НА ОСНОВЕ ПОЛЕВОГО ТРАНЗИСТОРА СО СТРУКТУРОЙ «КРЕМНИЙ НА ИЗОЛЯТОРЕ» *

А. А. Бердюгин², Е. В. Дмитриенко^{1,2}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

² *Новосибирский государственный университет*

A. A. Berdyugin^{1,2}, 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

Бурное развитие области создания биосенсоров привело к разработке большого количества различных типов устройств для обнаружения биомолекул. Перспективным типом биосенсоров являются электрохимические биосенсоры и, в частности, микро- и нано- проволочные сенсоры на основе полевых транзисторов со структурой «кремний на изоляторе» — КНИ-транзисторов. Такие сенсоры не требуют введения дополнительных меток в аналит, высокочувствительны и для измерения используют малое количество образца. Важной проблемой при создании устройств такого типа является воспроизводимость результатов электрохимических измерений. Связано это главным образом с миниатюризацией сенсорных элементов и отсутствием универсальных подходов для проведения исследований. Данная работа посвящена исследованию влияния факторов среды, в которой может находиться аналит на возможность его выявления, определению параметров детекции специфических последовательностей нуклеиновых кислот и оптимизации измерений с целью получения достоверных и воспроизводимых результатов.

Abstract

Rapid development of the field of biosensors has led to the development of a large number of different types of devices for detecting biomolecules. A promising type of biosensors are electrochemical biosensors and, in particular, micro- and nanoscaled sensors

© А. А. Бердюгин, Е. В. Дмитриенко, 2018.

* Работа проведена в рамках выполнения проекта КП ФНИ СО РАН II.1 (ГЗ № 0309-2018-0017).

based on field-effect transistors with the structure “silicon on an insulator” — SOI transistors. Such sensors do not require the introduction of additional labels in the analyte, are highly sensitive, and a small amount of sample is used for the measurement. An important problem in creating devices of this type is the reproducibility of the results of electrochemical measurements. This is mainly due to the miniaturization of sensory elements and the lack of universal approaches for conducting research. This work is devoted to the study of the influence of environmental factors in which an analyte can be found for the possibility of detecting it, determining the parameters of detection of specific nucleic acid sequences, and optimizing measurements in order to obtain reliable and reproducible results.

Для детекции специфических последовательностей нуклеиновых кислот в настоящее время разработано большое количество разнообразных подходов. Созданы биосенсоры, чья работа основана на различных принципах. Одним из критериев, по которому можно разделить все сенсоры, является наличие специфических меток, которые позволяют детектировать целевые объекты, так называемые меточные и безметочные подходы. Для первых типов сенсоров необходимой стадией является введение меток для детекции в систему измерений, например, флуоресцентных, электрохимических, оптических и др.

После изобретения полевого транзистора в 1970, одним из направлений применения этой технологии в области биотехнологий стало использование биосенсоров такого типа для детекции различных аналитов [1]–[2]. Полевые транзисторы относят к безметочным системам детекции, то есть позволяют напрямую определять наличие аналита, что является их безусловным преимуществом.

Среди широкого класса различных материалов и методов изготовления нанопроволочных сенсоров одними наиболее перспективных являются нанопроволоки на нанослоях «кремний на изоляторе» (КНИ). Кремниевые нанопроволки многообещающий чувствительный материал, привлекающий внимание исследователей из-за их высокого соотношения поверхности к объему, биосовместимости и уникальных подстраиваемых электрических, оптоэлектронных и термических свойств [3]–[4]. Эти свойства сильно улучшают такие параметры сенсора как селективность, чувствительность, временной отклик и способность осуществлять безметочную детекцию.

Детекция нуклеиновых кислот востребована в различных областях молекулярной биологии, биомедицинской химии и медицины. Нуклеиновые кислоты могут являться биомаркерами определенных заболеваний. В качестве биомаркеров в последнее время все более часто используются микроРНК — малые регуляторные РНК молекул, уровень которых напрямую может быть

связан с патологическими процессами, происходящими в организме. Таким образом, существует необходимость создания быстрых, чувствительных, безметочных, селективных биосенсоров для детекции НК. Однако, чтобы детектировать биомолекулы, необходимо определить параметры среды для наилучшего отклика системы.

В ходе выполнения данной работы проведена автоматизация установки для измерений сток-затворных характеристик микропроволочных КНИ транзисторов. Созданы программные коды для блока управления с использованием платы Arduino и интерфейса измерений. Исследовано влияние параметров среды, таких как ионная сила, pH и диэлектрическая проницаемость раствора, на сток-затворные характеристики микропроволочных КНИ транзисторов шириной 0,2 и 3 мкм, содержащих на поверхности различные группы. Показано что:

а) транзисторы шириной 0,2 мкм обладают воспроизводимыми сток-затворными характеристиками только при проведении измерений на воздухе;

б) транзисторы шириной 3 мкм как с немодифицированной, так и с модифицированной APTES или GOPTS поверхностью чипов, обладают воспроизводимыми сток-затворными характеристиками при проведении измерений на воздухе и в различных растворах;

в) установлено, что модификация поверхности КНИ транзисторов, ионная сила, pH и диэлектрическая проницаемость среды, в которую они помещены, влияют на сток-затворные характеристики. Определены критерии выбора условий среды для детекции заряженных биомолекул: I) значение pH буферного раствора должно быть таким, чтобы поверхность не несла значительного заряда; II) ионная сила раствора должна быть минимальной; III) для получения максимального отклика измерения оптимально проводить на воздухе.

Таким образом, исследовано влияние параметров детектируемой среды на эффективность выявления нуклеиновых кислот биосенсором на основе полевого транзистора со структурой «кремний на изоляторе». Показана возможность достоверной, специфической и селективной детекции РНК-мишени на 3 мкм КНИ транзисторах.

Литература

1. K. Balasubramanian. Challenges in the use of 1D nanostructures for on-chip biosensing and diagnostics: A review. // *Biosens. Bioelectron.* — 2010. — V. 26(4). — P. 1195–1204.
2. L. N. Cella, W. Chen, N. V. Myung, and A. Mulchandani. Single-Walled Carbon Nanotube-Based Chemiresistive Affinity Biosensors for Small Molecules: Ultrasensitive Glucose Detection. // *J. Am. Chem. Soc.* — 2010. — V. 132(14). — P. 5024–5026.

-
3. K.-I. Chen, B.-R. Li, and Y.-T. Chen. Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation. // *Nano Today*. — 2011. — V. 6(2). — P. 131–154.
 4. R. Ahmad, T. Mahmoudi, M. S. Ahn, and Y. B. Hahn. Recent advances in nanowires-based field-effect transistors for biological sensor applications // *Elsevier B. V.* — 2018. — V. 100.

**ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ
С РЕГУЛИРУЕМЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ
НА ОСНОВЕ НЕЙЛОНА-6 И ЕГО КОМПОЗИТОВ^{1*}**

PREPARATION OF NEW MATERIALS WITH CONTROLLED RELEASE
OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS BASED ON NYLON-6
AND ITS COMPOSITES

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 Branch of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

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

Аннотация

Таргетная доставка лекарственных средств — актуальная задача научных исследований по всему миру. Одним из возможных способов достижения адресной доставки является конструирование сложных систем, представляющих собой «умный» контейнер, который способен транспортировать препарат и высвобождать лекарственное средство только при достижении мишени. Использование таких систем может обеспечить контролируемое высвобождение, пролонгированное действие, а также адресность доставки за счет введения в конструкцию специфических лигандов, обеспечивающих нацеленность на мишень. В качестве носителей для таргетной доставки препарата обычно используют наноструктурированные частицы, такие как: нанокapsулы, наногели, наночастицы и нанотрубки. В данной работе были получены и охарактеризованы капсулированные формы цитостатика — доксорубина на основе нейлона-6 и его композитов. Определен размер и поверхностный потенциал полученных частиц/капсул, а также оптимальные условия загрузки доксорубина и емкость полимеров. Исследована эффективность высвобождения доксорубина

© Е. Н. Бобрикова, К. В. Разум, Е. В. Дмитриенко, 2018.

* Работа выполнена в рамках государственного задания и при поддержке программы РНФ 18-14-00357.

из полимерного каркаса в различных условиях. Проведено исследование токсичности и эффективности полученных частиц *in vitro* и *in vivo*.

Abstract

Targeted drug delivery is very actual problem of scientific research around the world. Designing complex systems such as smart containers is one possible way to achieve targeted delivery. They are able to transport and release the drug only when the target is reached. The use of such systems can provide controlled release, prolonged action, as well as targeted delivery by introducing into the design specific ligands that provide attainment target. Nanostructured particles, such as nanocapsules, nanogels, nanoparticles and nanotubes, are commonly used as agents for target drug delivery. In present study, the encapsulated forms of cytostatic-doxorubicin based on nylon-6 and its composites have been obtained and characterized. The size and zeta potential of nanoparticles/capsules are determined, as well as the optimal loading conditions for the preparation and the capacity of the polymers. The effectiveness of the release of doxorubicin from a polymeric matrix under different conditions has been studied. The toxicity and efficiency of particles *in vitro* and *in vivo* also were studied.

Актуальными объектами для направленной доставки являются противоопухолевые препараты, например, используемые в полихимиотерапии (ПХТ). На данном этапе развития клинической и экспериментальной онкологии ПХТ, включающая несколько цитостатиков с различным механизмом действия и токсическим профилем, является основным методом лечения онкологических заболеваний. Одним из часто используемых цитостатиков, входящих в ПХТ, является доксорубин.

Доксорубин (DOX) относится к семейству антрациклиновых антибиотиков. Препарат обладает широким спектром противоопухолевой активности, включая острые формы лейкемии, лимфомы Ходжкина и неходжкина, рака молочной железы, рака легких и саркому. Механизм противоопухолевой активности DOX состоит в интеркаляции ДНК и ее разрушении, ингибировании топоизомеразы II, образовании металлических комплексов с железом или медью и образовании свободных радикалов. Кроме этого, доксорубин восстанавливается до своего нестабильного метаболита, который при обратном окислении способен образовывать активные формы кислорода. Это в свою очередь может привести к разрушению клеточной мембраны, перекисному окислению липидов, окислительному стрессу, разрушению ДНК и включению апоптотических механизмов гибели клетки.

Доксорубин оказывает сильный токсический эффект на весь организм, основной проблемой является его кардиотоксичность. Даже при коротком курсе применения препарат может вызывать сердечную недоста-

точность через продолжительный временной период (от 4 до 20 лет) [1]. Капсулирование цитостатика, таргетная доставка и его контролируемое высвобождение может повысить эффективность и снизить неблагоприятные эффекты стандартной полихимиотерапии.

Таким образом, целью работы была разработка дизайна и способа получения капсулированных форм лекарственных препаратов (на примере доксорубина) на основе нейлона-6 и его композитов, а также изучение и характеристика их физико-химических и биологических свойств.

Ранее в лаборатории биомедицинской химии (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН) был предложен подход к получению частиц из нейлона-6 и композитов на его основе, проведен ряд исследований направленных на изучение способности проникновения частиц и композитных материалов в клетку. Было показано, что и частицы, и композитные материалы на основе нейлона-6, проникают внутрь клеток и не обладают выраженной токсичностью.

В ходе работы было апробировано три варианта получения капсулированного доксорубина:

1. частицы на основе нейлона-6 (Ny);
2. частицы на основе оксида железа Fe_3O_4 , покрытые оболочкой из нейлона-6 (Fe_3O_4 -Ny);
3. нанокapsулы на основе нейлона-6.

Все типы частиц были получены по авторской методике [2], и в дальнейшем были использованы в качестве высокоэффективного сорбента. Получение нанокapsул подразумевает формирование полимерного нанослоя на твердом центре с последующим удалением последнего. Таким образом, формируются полые наноструктуры, способные выступать в качестве наноконтейнеров для лекарственных препаратов. Частицы и нанокapsулы были охарактеризованы (размер, поверхностный потенциал) методами динамического светорассеивания (Malvern, UK), оптической и просвечивающей электронной микроскопией (ПЭМ). Загрузку частиц доксорубином проводили, варьируя концентрацию, состав раствора препарата, pH среды. Параметры высвобождения цитостатика исследовали в различных условиях, в том числе и в биологических жидкостях (сыворотке). Были определены оптимальные условия для загрузки и высвобождения доксорубина, эффективность и скорость его высвобождения, ёмкость частиц. Установлено, что высвобождение доксорубина возрастает при снижении pH раствора, что, в перспективе, может быть использовано для специфичного высвобождения препарата в более кислых компартментах клетки, например эндосомах, а не в межклеточном пространстве.

В ходе исследования была продемонстрирована возможность модификации поверхности всех типов полученных частиц, путем введения на поверх-

ность направляющего агента, например, коротких фрагментов нуклеиновых кислот.

Для всех типов полученных конструкций исследована токсичность *in vitro* и *in vivo*, поскольку одним из основных требований к компонентам систем доставки является отсутствие таковой. Первоначально с помощью МТТ-теста было показано, что все полученные типы частиц не цитотоксичны по отношению к клеткам линии A549. Далее был проведен ряд исследований токсичности *in vivo*. В ходе экспериментов было показано, что при внутрибрюшинном введении лабораторным животным частицы не оказывают видимых токсических проявлений.

Таким образом, полученные данные подтверждают перспективность новых материалов с регулируемым высвобождением биологически активных соединений на основе нейлона-6 и его композитов. В настоящее время ведется исследование *in vivo* терапевтического эффекта полученных конструкций.

Литература

1. Zhu Q., Jia, L., Gao, Z. et al. A tumor environment responsive doxorubicin-loaded nanoparticle for targeted cancer therapy //Molecular pharmaceutics. — 2014. — Т. 11. — №. 10. — С. 3269–3278.
2. Дмитриенко Е. В., Пышная И. А., Рогоза А. В., Пышный Д. В. Способ получения молекулярно-импринтированных полимеров // Патент РФ № 2385889 от 10.04.2010.

МОДЕЛИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ *IN SILICO*

MODELING OF PLANT CELL ANTIOXIDANT SYSTEM *IN SILICO*

А. В. Бобровских, А. В. Дорошков

*ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
ФГБОУ Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

A. V. Bobrovskikh, A. V. Doroshkov

*FRC Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russia
Novosibirsk State University, Russia*

E-mail: alex-bobrovskikh@mail.ru

Аннотация

В исследовании проведена интеграция литературных данных и экспрессионных данных о компонентах антиоксидантной системы растительной клетки в математическую модель в среде COPASI. Получено стационарное решение для системы с подробным описанием взаимосвязей. Модель описывает поведение антиоксидантной системы растительной клетки, используя реальные кинетические механизмы реакций и особенности функционирования системы в разных компартментах.

Abstract

This study included the integration of literature data and expression data of the components of the plant cell antioxidant system in a mathematical model in the COPASI environment. System with a detailed description of the relationships have a steady-state solution. This model describes the behavior of the plant's antioxidant system, using real kinetic mechanisms of reactions and features of the functioning of the system in different compartments.

Моделирование биологических систем является перспективным подходом в биологии. Метод позволяет интегрировать разного сорта данные для описания свойств биологической системы. Целью моделирования является добиться описания свойств системы с точностью, достаточной для получения новых знаний о ее функционировании в стационарных и измененных состояниях. COPASI является эффективной средой для построения биологических моделей (Hoops et al., 2006).

Активные формы кислорода (АФК) — одни из ключевых молекул, повреждающие растения в ходе метаболических процессов. В стрессовом состоянии (холод, засуха, засоленность и пр.) продукция АФК многократно усиливается, что приводит к повреждению клеточных мембран, органелл, биополимеров клетки. В конечном счете, сверхпродукция АФК в ходе стрессов может привести к снижению продуктивности растений и их гибели. Для борьбы с радикалами у растений существует антиоксидантная система (АОС). Биохимически система состоит из 7 классов антиоксидантных ферментов (аскорбатпероксидаза, глутатионпероксидаза, каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза, дегидроаскорбатредуктаза, монодегидроаскорбатредуктаза) и веществ-антиоксидантов (аскорбат, глутатион и их окисленные формы).

Изучение особенностей регуляции и динамики АОС является перспективным как в фундаментальном плане (получение знаний о регуляции сложноорганизованной биохимической системы), так и в прикладном (увеличение продуктивности сельскохозяйственных культур в районах с неблагоприятным или изменчивым климатом).

Поведение системы в разных состояниях (например, разное освещение или стресс) недостаточно изучено. Существуют математические модели, которые описывают отдельные части АОС у растений. Например, модель, которая описывает поведение аскорбат-глутатионового цикла в хлоропластах с учетом суточной динамики и колебаний освещения (Valero et al., 2015). Модель описывает поведение системы в зависимости от разных потоков электронов через фотосистему. Однако, модель не описывает АОС в полном составе и ограничена одним компартментом. Кроме того, модель не описывает регуляцию системы в стрессовых условиях.

Представляем новую модель АОС растительной клетки, разработанную в среде COPASI. Наше исследование включает комплексное описание динамики растительной АОС в стационарном состоянии, учитывает особенности организации данной системы в разных компартментах. Кинетические механизмы, активность ферментов и скорости генерации радикалов были взяты на основе литературных данных и экспрессионных баз данных. В дополнение к хлоропластам, были построены модели пероксисом и митохондрий. Были найдены стационарные состояния для описанных систем.

Литература

1. Hoops S. et al. COPASI—a complex pathway simulator // *Bioinformatics*. — 2006. — Т. 22. — №. 24. — С. 3067–3074.
2. Valero E. et al. Modeling the ascorbate-glutathione cycle in chloroplasts under light/dark conditions // *BMC systems biology*. — 2015. — Т. 10. — №. 1. — С. 11.

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА КАЧЕСТВО ЛИОФИЛИЗАТОВ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

FREEZING TIME EFFECT ON THE QUALITY OF LYOPHILIZATES OF LIVE TULAREMIA VACCINE

С. В. Борисова¹, Д. Н. Бибилов¹, А. В. Комиссаров^{1,2},
О. А. Волох¹, С. А., Бадарин¹, Н. В. Сеницына¹,
Н. И. Костылева¹, А. К. Никифоров^{1,2}

¹ ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный
институт “Микроб”», 410005 Саратов, ул. Университетская, д. 46
² ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет
им. Н. И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства РФ, 410012
Саратов, Театральная пл., 1

S. V. Borisova¹, D. N. Bibikov¹, A. V. Komissarov^{1,2}, O. A. Volokh¹,
S. A. Badarin¹, N. V. Sinityna¹, N. I. Kostyleva¹, A. K. Nikiforov^{1,2}

¹ FGHI Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”,
410005, 46 Universitetskaya St., Saratov
² N. I. Vavilov Saratov State Agrarian University of the Ministry of Agriculture of
the Russian Federation, 410012, 1 Teatral'naya Square, Saratov

Аннотация

Изучено влияние времени замораживания на качество лиофилизатов живой туляремийной вакцины. Выявлено, что выдерживание препаратов при температуре минус (40±5) °С в течение следующих промежутков времени: 2–3 ч, 5–6 ч, 10–11 ч, 15–16 ч, 23–24 ч оказывает одинаковое влияние на показатели лиофилизатов.

Abstract

Studied has been the effect of freezing time on the quality of lyophilizates of live tularemia vaccine. It is revealed that storing of the preparations at -40±5 °C within the following time periods: 2–3 h, 5–6 h, 10–11 h, 15–16 h, 23–24 h has an equal impact on the properties of lyophilizates.

В технологии лиофилизации препаратов первой процедурой является его замораживание, от правильного проведения которого зависит качество гото-

вого продукта. Поэтому представляло определенный научно-практический интерес изучение влияния продолжительности замораживания на качество лиофилизатов туляремийной вакцины. Флаконы с препаратом замораживали до температуры материала минус $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$ на полках сублимационной сушильной установки Epsilon 2-6D (Martin Christ, Германия). При этой температуре материал выдерживали в течение следующих промежутков времени: 2–3 ч, 5–6 ч, 10–11 ч, 15–16 ч, 23–24 ч. Далее конденсатор-вымораживатель охлаждали до температуры минус $(65 \pm 5)^\circ\text{C}$. Во флаконы вставляли специальные пробки для лиофилизации таким образом, чтобы боковые прорезы в пробках не перекрывались полностью горлышком флакона. Затем создавали остаточное давление в сушильной установке $(0,1 \pm 0,01)$ мваг. Процесс сублимации вели от температуры полок минус $(40 \pm 5)^\circ\text{C}$ до $(30 \pm 2)^\circ\text{C}$ со скоростью повышения температуры полок не более 5°C в час. При достижении температуры материала $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ флаконы герметизировали непосредственно в камере сушильной установки, используя винтовой прижиматель пробок, являющийся конструктивным элементом сушильной установки. После герметизации флаконов давление в установке выравнивали с атмосферным и производили выгрузку флаконов и обкатку их алюминиевыми колпачками.

Оценку влияния времени замораживания на качество лиофилизатов проводили по следующим показателям, нормируемым фармакопейной статьей предприятия на живую туляремийную вакцину: внешний вид препарата, остаточная влажность, растворимость, pH, седиментационная устойчивость (время расслоения), жизнеспособность.

Результаты исследований представлены в таблице. По внешнему виду полученные лиофилизаты представляли собой сухую массу коричневатого цвета в виде хорошо сформированной таблетки. Остаточная влажность для препаратов была практически одинаковой и составляла от 0,8 % до 1,1 %. Значение pH растворов, полученных после растворения лиофилизатов, было от 6,9 до 7,1. Полученные лиофилизаты легко растворялись в 1 мл воды в течение, в среднем, 30 секунд. Расслаивание препаратов в течение более 60 мин обнаружить не удалось. Жизнеспособность образцов после их лиофилизации практически не менялась в сравнении с жидкими препаратами. Значения всех показателей соответствовали нормируемым требованиям. Полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод об одинаковом влиянии времени замораживания на показатели лиофилизатов. В практическом плане это дает возможность варьировать временем начала сублимационного высушивания.

**Результаты исследований влияния времени замораживания
на качество лиофилизатов живой туляремийной вакцины**

Время замораживания, ч	Остаточная влажность, %		Растворимость, секунд		pH		Седиментационная устойчивость, мин		Жизнеспособность, %	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
2–3	н/о	0,8	н/о	30	6,9	7,0	н/о	более 60	62	60
5–6		0,8		35	7,0	7,1			58	55
10–11		1,1		25	7,1	7,1			69	69
15–16		1,0		30	6,9	6,9			54	53
23–24		0,9		30	7,0	7,0			70	68

Примечание. I — значение показателя жидкого препарата, II — значение показателя лиофилизата, н/о — не определяли.

**КОМБИНИРОВАННАЯ ГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКАЯ
ТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ
МЫШЬЯКСОДЕРЖАЩЕГО
МЕДНО-ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА ***

COMBINED BIOHYDROMETALLURGICAL TECHNOLOGY FOR
TREATMENT OF ARSENIC-BEARING COPPER-ZINC CONCENTRATE

А. Г. Булаев^{1,2}, Е. А. Мельникова^{2,3}, Ю. А. Ёлкина^{1,2}, Л. А. Гавирова¹

¹ *Биологический факультет Московского государственного
университета имени М. В. Ломоносова*

² *Институт микробиологии им. С. Н. Виноградского,
ФИЦ Биотехнологии РАН*

³ *Московская государственная академия ветеринарной медицины биотех-
нологии — МВА имени К. И. Скрябина*

A. G. Bulaev^{1,2}, E. A. Mel'nikova^{2,3}, Y. A. Elkina^{1,2}, L. A. Gavirova¹

¹ *Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University*

² *Winogradsky Institute of Microbiology,
Research Center of Biotechnology RAS*

³ *Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology
n. a. K. I. Skryabin*

E-mail: bulaev.inmi@yandex.ru

Аннотация

Целью исследования являлась разработка гидрометаллургической технологии для переработки мышьяксодержащего медно-цинкового концентрата, включающей стадии биовыщелачивания и химического окисления. В предварительных экспериментах была выявлено, что оптимальная температура для биовыщелачивания меди и цинка составила 50 °С. Биовыщелачивание концентрата в лабораторных реакторах в оптимальных условиях (плотность пульпы 1:10, время пребывания 7 суток, переменный температурный режим 40 °С/50 °С) позволило извлечь 29 и 78 % Cu и Zn. Высокотемпературное доокисление твердого остатка биовыщелачивания при 90 °С с использованием трехвалентного железа жидкой фазы пульпы и хлорида натрия позволило увеличить степень извлечения Cu и Zn до 48 и 84 %, соответственно.

© А. Г. Булаев, Е. А. Мельникова, Ю. А. Ёлкина, Л. А. Гавирова, 2018.

* Исследование было выполнено при поддержке Гранта Президента Российской Федерации Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук № МК-6639.2018.8.

Abstract

The goal of the present study was to develop biohydrometallurgical technology for treatment of arsenic-bearing copper-zinc concentrate, which included stages of bioleaching and chemical oxidation. Preliminary experiments demonstrated that optimal temperature for copper and zinc bioleaching was 50 °C. Bioleaching of the concentrate under optimal conditions in reactors (pulp density 1:10, residence time 7 days, variable temperature mode 40 °C/50 °C) made it possible to extract 29 and 78 % of Cu and Zn. High temperature oxidation of solid bioleach residue at 90 °C using ferric iron from liquid phase of the pulp and NaCl made it possible to extract 48 and 84 % of copper and zinc, respectively.

Цветная металлургия сталкивается с проблемой истощения запасов минерального сырья, пригодного для получения кондиционных концентратов из медных и медно-цинковых руд. Одним из типов медных руд, использование которых затруднено из-за высоких экологических рисков, являются руды с высоким содержанием минералов меди и мышьяка (главным образом, энаргит Cu_3AsS_4 и теннантит $\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$). Традиционная пирометаллургическая переработка таких руд предполагает использование специальных систем очистки газов, что снижает рентабельность их переработки. Кроме того, многие медные и медно-цинковые руды с высоким содержанием мышьяка, например, с ряда месторождений Южного Урала, являются труднообогатимыми по причине тонкого прорастания минералов меди и цинка с пиритом. Получение кондиционных концентратов из такого сырья является технологической проблемой. Биогидрометаллургические технологии могут быть перспективными для переработки руд такого типа. Для переработки бедных и забалансовых медных руд в мире достаточно широко используется кучное биовыщелачивание [5]. Реакторное биоокисление может применяться для переработки некоторых сульфидных концентратов (золотосодержащих, некондиционных концентратов цветных металлов, в том числе, с высоким содержанием мышьяка) [8].

Целью данной работы было проведение лабораторных испытаний по реакторному биовыщелачиванию медно-цинкового концентрата с целью определения целесообразности применения биогидрометаллургических технологий для переработки сырья такого типа. Основными сульфидными минералами концентрата были пирит (FeS_2), халькопирит CuFeS_2 , теннантит ($\text{Cu}_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$), сфалерит (ZnS). Концентрат содержал 6.22 % меди, 7.30 % цинка, 24.4 железа и 38.6 % серы.

Предварительные эксперименты по биовыщелачиванию халькопирита и теннантита проводили в колбах со 100 мл жидкой питательной среды, содержащей соли азота и фосфора и 0.02 % дрожжевого экстракта, 2 г минералов с использованием смешанной культуры ацидофильных микроорганизмов на ротационном шейкере при различных температурах. Оптимальной

температурой для биовыщелачивания халькопирита и теннантита были интервалы 50–55 °С и 45–50 °С, соответственно (рис. 1, А, Б). Биовыщелачивание концентрата в аналогичных условиях показало, что оптимальная температура для выщелачивания меди и цинка составила 50 °С (рис. 1, В).

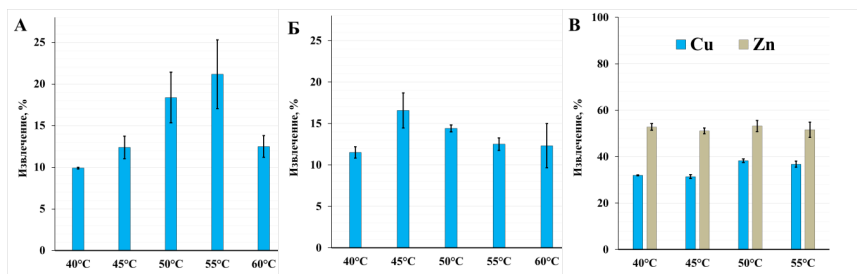


Рис. 1. Степень выщелачивания меди из халькопирита (А) и теннантита (Б), а также меди и цинка из концентрата (В) за 20 суток биовыщелачивания

Процесс реакторного биовыщелачивания проводили в непрерывном режиме в цепи из трех лабораторных реакторах, снабженных верхнеприводными мешалками (500 об/мин), ультратермостатами для поддержания температуры и компрессорами для аэрации (5 л/мин). Плотность пульпы (Т:Ж) составляла 1:10. В первый реактор цепи также осуществлялась подача CO_2 , что позволяет повысить активность автотрофных микроорганизмов, окисляющих сульфидные минералы. Общее время пребывания в цепи из трех реакторов составляло 7 сут, (3 сут — в первом реакторе и по 2 сут во втором и третьем). Было показано, что биовыщелачивание в реакторах при 40 °С позволило извлечь 26 и 90 % Cu и Zn в раствор (рис. 2, А). При этом при 50 °С степень выщелачивания металлов была ниже, чем при 40 °С (результаты не показаны). Поэтому было проведено также биоокисления в переменном температурном режиме, где в первом реакторе температура составляла 40 °С, а во втором и третьем — 50 °С. Более низкая температура в первом реакторе обеспечивает накопление биомассы и позволяет расти автотрофным микроорганизмам, рост которых может подавляться при высоких температурах. Переменный температурный режим позволил извлечь в раствор 30 и 78 % Cu и Zn (рис. 2, Б).

Таким образом, переменный температурный режим обеспечил небольшое повышение извлечения меди, но привел к некоторому снижению степени извлечения цинка.

После биоокисления твердый остаток процесса биовыщелачивания концентрата подвергали высокотемпературному выщелачиванию в течение

25 часов. Для проведения процесса окисления 1 л пульпы после биоокисления помещали в титановый реактор и нагревали до 90 °С. Проведение процесса в таких условиях позволило использовать ионы Fe^{3+} , которые накапливались в жидкой фазе пульпы в процессе биоокисления, как окислитель для химического выщелачивания. Исследовали также влияние хлорид-иона на извлечение цветных металлов, для чего в пульпу перед высокотемпературным выщелачиванием вносили 0.5 и 1 М хлорида натрия, который может катализировать окисление сульфидных минералов.

Окисление без добавления хлорида натрия не позволило увеличить степень извлечения цветных металлов (рис. 3). Выщелачивание же в присутствии 1 М позволило извлечь 48 и 84 % меди и цинка, соответственно.

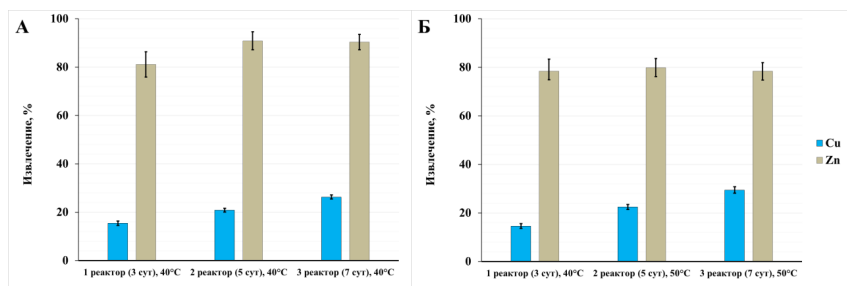


Рис. 2. Степень извлечения меди и цинка из концентрата в ходе реакторного биовыщелачивания при 40 °С и в переменном температурном режиме

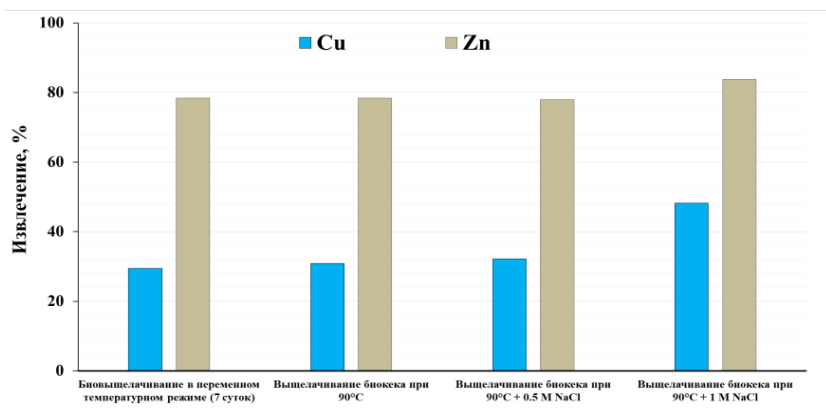


Рис. 3. Степень извлечения меди и цинка при химическом окислении (90 °С, 25 часов) в присутствии хлорида натрия

Результаты, полученные в данной работе, могут позволить разработать новую биогидрометаллургическую технологию, которая будет включать стадию биоокисления, позволяющую наработать раствор окислителя (ионов Fe^{3+}), и стадию высокотемпературного химического окисления, которая позволяет повысить эффективность выщелачивания трудноокисляемых сульфидных минералов.

ПОЛУЧЕНИЕ CRISPR-АССОЦИИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА Cpf1

PRODUCTION OF CRISPR-ASSOCIATED RECOMBINANT PROTEIN Cpf1

В. А. Васиховская

*Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

V.A. Vasikhovskaya

Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

E-mail: vasikhovskaya_v@mail.ru

Аннотация

Данная работа направлена на создание отечественного коммерческого препарата эндонуклеазы Cpf1, входящей в бактериальную систему иммунного ответа CRISPR, для использования в генно-инженерных работах. В ходе работы ген, кодирующий фермент Cpf1, был обнаружен в бактериальном штамме *Moraxella bovis*, было проведено его клонирование и экспрессия, а также проведена проверка активности полученного препарата.

Abstract

This study is focused on producing a domestic commercial Cpf1 endonuclease-based kit from bacterial immune system known as CRISPR for genetic engineering applications. In the course of work, the gene encoding the Cpf1 enzyme was found out in the bacterial strain *Moraxella bovis*, gene cloning and expression were carried out and the enzyme activity was examined.

По результатам публикации журналом Science ежегодного списка наиболее важных открытий в топ-10 трижды (в 2012, 2013 и 2015 году) входили достижения в области геномного редактирования, в частности возможности применения бактериальной системы CRISPR (**clustered regularly interspaced short palindromic repeats**, короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами) для редактирования геномов [1]. За прошедшие годы эта технология заняла свое место в арсенале молекулярных биологов и постепенно внедряется в клиническую практику.

Системы CRISPR представляют собой системы иммунного ответа прокариот, принцип действия которых основан на специфическом расщеплении чужеродной ДНК. Комплекс специальных белков интегрирует небольшие фрагменты вирусной нуклеиновой кислоты (протоспейсеры) в хозяйскую ДНК в виде CRISPR-кассеты. Первичный транскрипт, образующийся с CRISPR-кассеты, затем процессируется в направляющую РНК (gРНК), частично комплементарную геному вируса или плазмиды. При повторном заражении тем же вирусом gРНК образует комплекс с эндонуклеазой и специфически нацеливает ее, в результате чего чужеродная ДНК расщепляется. Благодаря своим свойствам эта система позволяет редактировать геном *in vivo*, но кроме того может использоваться и *in vitro* для клонирования и гидролиза целевой ДНК в конкретном месте, что не всегда могут сделать эндонуклеазы рестрикции, так как их сайтов в геноме может быть очень много.

Эндонуклеаза Cpf1 является не так давно открытым функциональным аналогом более известного белка Cas9 и имеет ряд преимуществ. gРНК, используемая Cpf1, более короткая (~ 42 н), что имеет практические преимущества перед длинной gРНК (~ 100 н) в системах на основе Cas9, поскольку более короткие рибоолигонуклеотиды значительно легче и дешевле синтезировать. Также Cpf1 разрезает двуцепочечную ДНК с образованием липких 5'-концов, тогда как Cas9 образует тупые концы. Cpf1 узнает небольшие Т-богатые (Cas9 — G-богатые) последовательности около сайта-мишени, называемые РАМ-сайтами (**p**rotospacer **a**djacent **m**otif — мотив, смежный с протоспейсером), и расщепляет ДНК на 18-23 пн ниже РАМ-сайта (Cas9 разрезает в 3 пн от РАМ-сайта). Это означает, что после восстановления нет нарушения сайта узнавания (первые 10–12 н после РАМ-сайта), и поэтому Cpf1 допускает множественные раунды расщепления ДНК. Узнавание Т-богатых РАМ-сайтов позволяет расширить диапазон ДНК-мишеней для редактирования АТ-богатых областей генома [2]. Также есть данные о том, что использование Cas9 для геномного редактирования нецелесообразно в связи с большим количеством возникающих при редактировании ошибок, что говорит о необходимости поиска альтернативных путей [3].

В связи с описанными выше преимуществами получение фермента Cpf1 представляется перспективной биотехнологической задачей как с точки зрения научного, так и экономического интереса, поскольку системы редактирования генома на основе Cpf1 производятся только зарубежными компаниями New England Biolabs и Integrated DNA Technologies (США), а российских производителей каких-либо CRISPR-систем в настоящее время не существует.

Исследование проводилось на бактериях рода *Moraxella* с тремя штаммами: *Moraxella bovis*, *Moraxella nonliquefaciens* и *Moraxella species*. Из литературных данных известно, что ген *cpfl* обнаружен в штаммах бактерий рода *Moraxella*, поэтому сначала был проведен теоретический поиск и выравнивание последовательностей гена *cpfl* среди штаммов данных бактерий, представленных в базе данных GenBank. Согласно полученным данным последовательности имеют консервативные районы, что дало нам основание полагать их наличие и в геномах исследуемых бактерий и, соответственно, подбирать праймеры. Выравнивание областей, фланкирующих начало и конец гена, также показало наличие консервативных районов, поэтому теоретически было возможно амплифицировать ген полностью, однако на практике это не удалось реализовать. Поэтому были подобраны ген-специфичные праймеры, в результате амплификации с которыми был бы получен ген без начального и конечного участков. Экспериментально было показано наличие гена у всех трех исследуемых штаммов, полная последовательность гена была установлена для штамма *Moraxella bovis* с использованием методики “прогулки по хромосоме”.

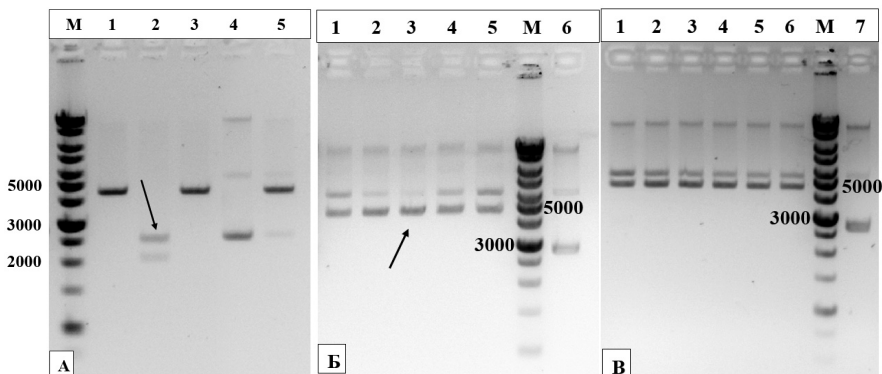
Клонирование гена *cpfl* проводилось по методу гомологичной рекомбинации In-Fusion в составе экспрессирующего вектора pET15b в виде двух конструкций — содержащей и не содержащей гистидиновый олигопептид перед началом гена. Встраивание проводилось двумя способами, так как с одной стороны очистка гистидинового варианта проста в исполнении, но с другой стороны гистидиновый олигопептид может влиять на функционирование белка, а его отщепление от полученного рекомбинантного белка экономически невыгодно.

Наработку биомассы проводили в штамме *E. coli* BL21 DE3 pLysS. Для определения оптимального времени экспрессии индукцию ИПТГ проводили в течение различного времени. Было установлено, что экспрессия происходит в обеих конструкциях и максимальный выход белка достигается при инкубации с ИПТГ свыше 5 часов. Кроме того, в обоих вариантах помимо целевого белка (145 кДа) происходит накопление нецелевого белка массой около 110 кДа - вероятно продуцируется укороченный вариант Cpf1.

Для проведения хроматографической очистки гистидинового варианта была подобрана следующая последовательность сорбентов: Ni-NTA — Sephacryl 200 — гидроксипатит. Безгистидиновый вариант белка очищали последовательно на ДЕАЕ-целлюлозе и гидроксипатите. В результате очистки и концентрирования было получено 3 препарата — два с гистидиновым олигопептидом на N-конце, но с различной массой (110 и 150 кДа) и один безгистидиновый вариант.

Для тестирования функциональной активности полученных препаратов была выбрана плаزمиды pBR322 с единственным сайтом гидролиза Cpf1.

Направляющая РНК была синтезирована химическим путем в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН. Гидролиз проводился в течение 1 ч при 37 °С со стадией дополнительного гидролиза *EcoRI* для того, чтобы судить о степени гидролиза по получению двух бендов (состав буфера х 1 (pH=7,9): 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 100 мкг/мл BSA). В данных условиях активность проявляет полный гистидиновый вариант белка. Для него было изучено влияние концентрации одновалентных ионов и величины pH на активность белка. По результатам исследований гидролиз эффективнее проходит в буфере, содержащем NaCl в концентрации 100 mM, а значение pH в диапазоне от 7.0 до 8.5 не оказывает существенного влияния на полноту протекания гидролиза.



Гидролиз pBR322 ферментами *CpfI* и *EcoRI*:

А: 1 — HisCpfI_1, 2 — HisCpfI_2, 3 — CpfI_1, 4 и 5 — исходная и линейризованная по сайту *EcoRI* pBR322 соответственно;

М — 50 кб маркер (СибЭнзим). Оптимизация условий гидролиза ферментом 6xHisCpfI плазмиды pBR322:

Б: 1-5 — буфер с C (NaCl) = 0, 50, 100, 150 и 200 mM соответственно, 6 — исходная pBR322, М — 50 кб маркер (СибЭнзим).

В: 1-6 — буфер с pH = 7.0, 7.4, 7.6, 7.9, 8.0, 8.5 соответственно, 7 — исходная pBR322, М — 50 кб маркер (СибЭнзим).

Литература

1. Travis, J. Making the cut // Science. — 2015. — V. 350 — № 6267 — P. 1456–1457.
2. Zetsche B. [и др.]. CpfI Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System // Cell. 2015. № 3 (163). С. 759–771.
3. Kosicki M., Tomberg K., Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements // Nature biotechnology. — 2018. — T. 36. — №. 8. — С. 765.

**ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ
УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ПРЕПАРАТЕ
АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА**

**FLOW CYTOMETRY IN DETERMINING THE LEVEL
OF SPECIFIC ANTIBODIES IN AN RABIES
IMMUNOGLOBULIN DRUG**

С. В. Генералов, А. Л. Кравцов, В. А. Кожевников,
Ю. А. Гаврилова, Е. Г. Абрамова

*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов, Россия*

S. V. Generalov, A. L. Kravtsov, V. A. Kozhevnikov,
Yu. A. Gavrilova, E. G. Abramova

*FPHI Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe»
of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection
and Human Welfare, Saratov, Russia*

Аннотация

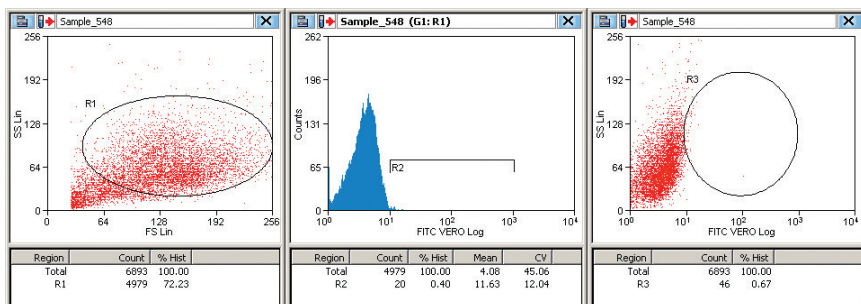
В настоящем исследовании рассматривается разработка метода определения уровня антирабических антител с использованием проточной цитометрии. Метод основан на измерении уровня флуоресценции в клетках, инкубированных в питательной среде, в которую добавляют смесь разведений антирабического иммуноглобулина и вируса бешенства.

Abstract

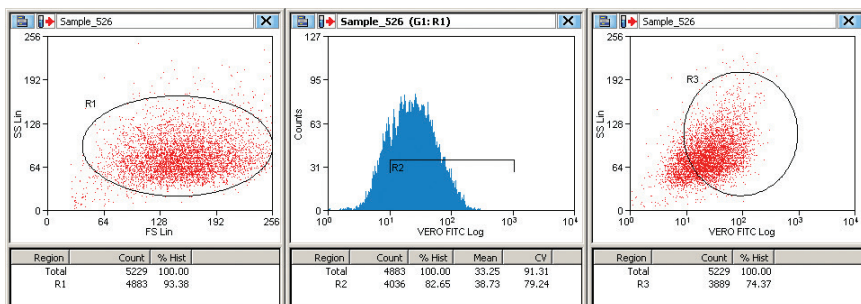
This study examines the development of a method for determining the level of anti-rabies antibodies using flow cytometry. The method is based on measuring the level of fluorescence in cells incubated in a nutrient medium to which dilutions of rabies immunoglobulin and rabies virus are added.

Вирус бешенства, относящийся к семейству Rhabdoviridae и роду Lyssavirus, вызывает у человека и животных инфекционное заболевание, характеризующееся абсолютной летальностью. Размножение вируса происходит в цитоплазме клеток восприимчивого организма или тканевой культуры. Указанное свойство вируса определило особенности методов его обнаружения в культуре клеток. Для детекции вируса бешенства инфицирован-

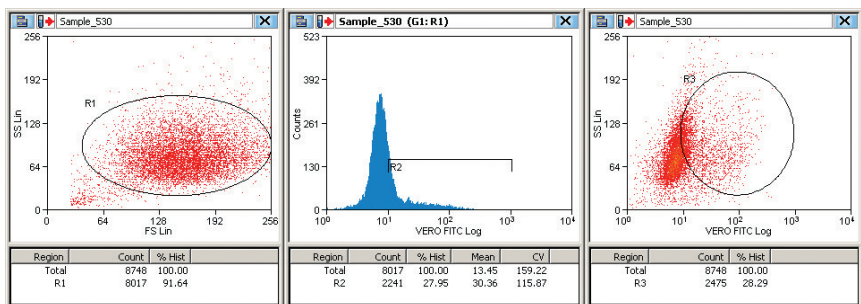
а



б



в



Цитогаммы клеточной культуры *Vero*: а — интактная клеточная культура без добавления антирабического иммуноглобулина (отрицательный контроль); б — клеточная культура, инфицированная рабочим разведением вируса бешенства (положительный контроль); в — клеточная культура, инфицированная смесью, содержащей рабочее разведение вируса бешенства и антирабический иммуноглобулин в разведении 1:500

ные клетки окрашивают специфическими флуоресцирующими антителами, а результат учитывают с помощью люминесцентной микроскопии. Аналогично на культуре клеток в реакции нейтрализации исследуют препараты, содержащие антирабические антитела. Данный принцип является основой таких методов обнаружения антирабических антител, как тест ингибции фокусов флуоресценции и метод определения вируснейтрализующих антител с использованием иммунофлуоресценции (FAVN-тест). Оба метода рекомендованы Всемирной Организацией здравоохранения в качестве замены реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах.

Тем не менее, методы исследования, связанные с использованием люминесцентной микроскопии, не позволяют провести точную количественную оценку относительного числа клеток, инфицированных вирусом. Логичным развитием указанных методологических подходов является использование проточной цитометрии.

Целью настоящей работы явилась разработка метода, основанного на использовании проточной цитометрии, для определения уровня специфических антител в препарате антирабического иммуноглобулина. Данный препарат используется для специфической постэкспозиционной профилактики бешенства у людей. Для оценки вируснейтрализующей способности антирабических сывороток и препарата иммуноглобулина к предварительно подготовленным разведениям исследуемых образцов добавляли рабочее разведение вируса бешенства штамма «Москва 3253». После нейтрализации вируса бешенства антирабическими антителами, образцы добавляли к клеточной культуре *Vero*. Клетки выращивали в CO₂-инкубаторе в течение 72 ч. После завершения выращивания, клетки фиксировали, окрашивали флуоресцирующими антирабическими антителами и проводили цитометрическое исследование. Результаты цитометрических исследований показаны на рисунке. Использование проточной цитометрии позволяет определить точное количество инфицированных клеток в исследуемой суспензии, а также степень их инфицирования по интенсивности флуоресценции. Уровень содержания антител в исследуемых образцах учитывают по калибровочному графику, построенному на основании данных исследования стандартного образца антирабического иммуноглобулина. Установлена высокая степень корреляции результатов, полученных с помощью предлагаемого метода в сравнении с результатами, полученных в реакции нейтрализации на белых мышах (0,95) и модифицированным методом FAVN (0,99).

Проточная цитометрия показала себя как быстрый, чувствительный и надежный метод исследования уровня антирабических антител. Получение точной информации о количестве инфицированных клеток в культуре, в дальнейшем позволит использовать проточную цитометрию на этапах контроля производства разрабатываемых и выпускаемых антирабических препаратов.

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ
И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПРИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ
ДЕЙСТВИИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА***

A STUDY OF MORPHOLOGICAL AND ULTRASTUCTURAL
CHANGES IN TUMOR CELLS DUE TO CYTOTOXIC EFFECT
OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

А. В. Глущенко¹, Е. В. Шекунов², К. С. Юрченко¹

¹ *ФГБНУ «Федеральный Исследовательский Центр
Фундаментальной и Трансляционной Медицины»*

² *Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

A. V. Glushchenko, *FSBSI «FRC FTM», Russia*

E. V. Shekunov, *NSU, Russia*

K. S. Yurchenko, *FSBSI «FRC FTM», Russia*

E-mail: xenia7yurchenko@gmail.com

Аннотация

Исследования противоопухолевых свойств вируса болезни Ньюкасла (ВБН) в экспериментальной терапии человеческих опухолей начались в середине XX века. Однако механизм цитотоксического действия до сих пор остается предметом изучения. Большинство научных статей, в которых предлагаются возможные механизмы вирус-опосредованной активации гибели опухолевых клеток, описывает апоптоз как основной специфический путь для ВБН инфицированных клеток в реализации цитотоксического противоопухолевого потенциала [1]. Однако за последние годы появились работы, подтверждающие способность ВБН запускать в трансформированных клетках аутофагию [2] и некротические изменения [3]. В данной работе, мы оценили структурные изменения опухолевых клеток под действием штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 в условиях реализации ВБН-индуцированной клеточной гибели.

Abstract

The antitumor properties of Newcastle disease virus (NDV) against human tumors in experimental therapy began in the middle of the XX century. However, at present the mechanism of cytotoxic effect remains the subject of study. The wide range of scientific

© А. В. Глущенко, Е. В. Шекунов, К. С. Юрченко, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00139.

papers, which suggest possible mechanisms of virus-mediated tumor cell death, describe apoptosis as the main specific pathway for NDV in infected cells in realization of cytotoxic antitumor potential [1]. However, in recent years new studies have appeared and confirmed the ability of NDV to trigger autophagy [2] and necrotic changes [3] in transformed cells. In this work, we evaluated structural changes of tumor cells due to NDV/Altai/pigeon/770/2011 strain in the conditions of activation of NDV-induced cell death.

Применения ВБН в качестве противоопухолевого агента изучается уже более 50 лет на моделях *in vitro*, *in vivo*, а также в нескольких успешных клинических испытаниях на людях [4]. Описаны процессы попадания вируса в опухолевую клетку и его репликации в ней [5], однако единого механизма клеточной гибели при виротерпии ВБН нет по сей день. Наличие противоречивых результатов исследований механизмов клеточной гибели ВБН-инфицированных опухолевых клеток может объясняться специфичностью каждого конкретного штамма, которые могут использовать различные механизмы индукции апоптоза/некроптоза/аутофагии и их комбинаций возможно даже на конкретных линиях опухолевых клеток.

Исследуемый штамм NDV/Altai/pigeon/770/2011, выделенный от сизого голубя на территории Алтайского края [6], уже показал эффективность цитотоксического действия при инфицировании опухолевых клеточных культур [7], а также появление некротических изменений в опухолевой ткани солидного узла ксенографта немелкоклеточной карциномы легкого человека A549 после серии интратуморальной виротерапии. В то же время пути клеточной гибели, активируемые вирусом NDV/Altai/pigeon/770/2011, не описаны. Таким образом, цель настоящего исследования заключалась в изучении выбора стратегии гибели раковых клеточных линий при воздействии на них штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: 1) Исследовать морфологические изменения в инфицированной культуре клеток. 2) Оценить ультраструктурные изменения в клетках методом электронной микроскопии.

Морфологические исследования проводились методом световой микроскопии после рутинной окраски гематоксилин-эозином по истечении 24 и 72 часов после инфицирования клеток. По прошествии 24 часов ядра клеток линии HeLa становятся менее выраженным, в отличие от контрольных, что характерно для клеток, зараженных вирусом. Цитоплазма приобретает гетероморфный вид, регистрируются небольшие включения. В опухолевой клеточной линии Hep-2 отмечено более ярко выраженными изменение цитоплазмы. Различного рода включения не регистрируются. По истечении 72 часов клетки линии HeLa начинают приобретать нехарактерную измененную форму. Отмечено нарушение целостности монослоя и появление раз-

раженных участков. Растет количество погибших клеток. Ядра клеток смещаются к периферии. Аналогичная картина наблюдается в клетках Нер-2.

Для оценки механизма клеточной гибели было проведено иммуноцитохимическое окрашивание клеток линий HeLa и Нер-2, зараженных штаммом NDV/Altai/pigeon/770/2011 (10 MOI), на маркеры TNF-alpha и Bcl-2 (Abcam). Положительное окрашивание на маркер апоптоза TNF-alpha наблюдали уже на первые сутки после инфицирования ВБН на обеих опухолевых линиях. Изменений при окрасе на наличие Bcl-2 выявлено не было. Можно предположить, что на ранних этапах действия штамма NDV/Altai/pigeon/770/2011 возможна активация внешнего пути апоптоза инфицированных клетках. Отсутствие же окраски фактора апоптоза Bcl-2 говорит о том, что внутренний путь активации при этом задействован не был. На основании этих данных, можно сделать вывод, что на ранних этапах заражения в клеточной линии HeLa и Нер-2 активация апоптоза может происходить по внешнему пути. Однако усиление внутренних путей апоптоза и смена клеточной гибели на некроптоз остается также возможным, что требует дальнейшего изучения.

Электронномикроскопического исследования продемонстрировало ультраструктурные изменения опухолевых клеток после заражению ВБН. Через 3 часа не было обнаружено видимых структурных изменений. На первые сутки в клетках линии Нер-2 было отмечено увеличение размеров митохондрий, вероятно, вследствие активной репликации вируса. При исследовании клеточной линии HeLa усиление активности синтетического аппарата также регистрируется, но происходит преимущественно за счет увеличения объема цистерн эндоплазматического ретикулума. Данное различие, вероятно, связано с лучшим развитием митохондрий в клеточной линии HeLa в сравнении с линией Нер-2.

На третьи сутки увеличивается количество эндосом, лизосом, аутофагосом в клетках. Природа такого явления, возможно, двояка и может быть связана с защитными функциями клетки на ранних этапах репликации вирусам. Однако, возможно, аутофагия вносит вклад в развитие апоптоза, так как отмечены случаи, когда данный процесс коррелируют с ранним апоптозом [8]. В обеих клеточных линиях наблюдается снижение в динамике запасов гликогена в клетках. Повышенное количество глюкозы считается одним из основных изменений метаболизма в раковых клетках [9]. Вследствие активно протекающих синтетических процессов ассоциированных с развитием ВБН, концентрация глюкозы начинает падать, что в свою очередь может приводить к нарушению метаболизма самой клетки.

Тем не менее, инфицированные клетки имеют отличительные черты некротической гибели, встречаются клетки с нарушениями целостности цито-

плазматической мембраны и выходом содержимого во вне клеточную среду. Данная картина может отражать развитие некроптоза вследствие схожих ультраструктурных изменений с морфологией некротизированных клеток. Регистрируется наличие клеточных образований с наличием вироплазмы. Тем не менее, клетки в состоянии апоптоза также присутствуют при действии данного штамма.

Таким образом, наше исследование подтверждает наличие онколитического потенциала у штаммов NDV/Altai/pigeon/770/2011 и демонстрирует развитый характер данного явления. Пути активации клеточной гибели посредством ВБН требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Zamarin, D. et al. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions // *Future Microbiol.* — 2012. — 7 (3). — P. 347–367.
2. Meng, C. et al. Newcastle disease virus triggers autophagy in U251 glioma cells to enhance virus replication // *Arch Virol.* — 2012. — 157 (6). — P. 1011–1018.
3. Koks, C. et al. Newcastle disease virotherapy induces long-term survival and tumor-specific immune memory in orthotopic glioma through the induction of immunogenic cell death // *Int J Cancer.* — 2015 — 136 (5). — P. E313–325.
4. NIH, U. S. Topics in integrative, alternative, and complementary therapies (PDQ®)—health professional version [Электронный ресурс] / NIH. — 2018a.
5. Puhlmann, J. et al. Rac1 is required for oncolytic NDV replication in human cancer cells and establishes a link between tumorigenesis and sensitivity to oncolytic virus // *Oncogene.* — 2010. — 29 (15). — P. 2205–2216.
6. Yurchenko K. S. et al. Complete genome sequence of a Newcastle disease virus isolated from a rock dove (*Columba livia*) in the Russian Federation // *Genome announcements.* — 2015. — T. 3. — №. 1. — C. e01514–14.
7. Yurchenko K. S. et al. Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model // *PloS one.* — 2018. — T. 13. — №. 4. — C. e0195425.
8. Kepp O. et al. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment // *Apoptosis.* — 2009. — T. 14. — №. 4. — C. 364–375.
9. Senft D., Ze'ev A. R. Regulators of mitochondrial dynamics in cancer // *Current opinion in cell biology.* — 2016. — T. 39. — C. 43–52.

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА СИНТЕЗА КОНЬЮГАТОВ
ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА
С АЛЕНДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ***

**METHOD FOR THE SYNTHESIS OF CONJUGATES
OF GRANULOCYTE-MACROPHAGE COLONY STIMULATING FACTOR
(GM-CSF) WITH ALENDRONIC ACID**

Т. И. Есина, Е. А. Волосникова, Я. С. Гогина,
Л. Р. Лебедев, Е. Д. Даниленко

Институт медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Бердск, Новосибирская область, Россия

T. I. Esina, E. A. Volosnikova, Y. S. Gogina, L. R. Lebedev, E. D. Danilenko

*Institute of Medical Biotechnology FBRI SRC VB "Vector" Rospotrebnadzor,
Berdsk, Novosibirsk region, Russia*

E-mail: esina_ti@vector.nsc.ru

Аннотация

В работе предложен способ конъюгирования высокоочищенного белка рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека с представителем класса бифосфонатов — алендроновой кислотой для создания средств доставки к костномозговому окружению.

Abstract

The work presents a method for conjugation of highly purified protein of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor with a representative of bisphosphonates — alendronic acid for the development of delivery system to the bone marrow environment.

Природный человеческий гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) является важным цитокином-регулятором миелопоэза и формирования клеток иммунной системы. Лекарственные

© Т. И. Есина, Е. А. Волосникова, Я. С. Гогина, Л. Р. Лебедев, Е. Д. Даниленко, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00236.

средства на основе рекомбинантного человеческого ГМ-КСФ (рчГМ-КСФ) активно применяют как стимуляторы кроветворения для восстановления числа нейтрофилов и лейкоцитов у больных нейтропенией, у онкологических больных, проходящих химиотерапию и лучевую терапию, при пересадках костного мозга, органов, тканей, для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, в том числе ВИЧ. Однако многие исследователи отмечают наличие у рчГМ-КСФ побочных эффектов.

Одним из способов снижения дозы препарата и его токсичности, позволяющего при этом сохранить (или усилить) его терапевтический эффект, является создание адресных средств доставки рчГМ-КСФ в костный мозг.

В качестве средства направленной доставки лекарственных веществ в костномозговое окружение большой интерес представляют бисфосфонаты, обладающие высоким сродством к ионам кальция и накапливающиеся в костной ткани. Одним из методических подходов является получение конъюгатов лекарственных веществ с бисфосфонатами, в частности с аминокислотой аллендроновой кислотой.

В ходе исследования разработана технология очистки белка рчГМ-КСФ из рекомбинантного штамма *E.coli* SG20050/p280GM, полученного трансформацией штамма-реципиента плазмидой p280GM, содержащей синтетический ген ГМ-КСФ, детерминирующий конститутивный синтез полипептида со свойствами ГМ-КСФ человека (Гилева и др., 1997). Среднее содержание мономера в готовой субстанции белка рчГМ-КСФ составляет $(98,1 \pm 0,2) \%$, молекулярная масса — (15100 ± 200) Да.

Конъюгаты рчГМ-КСФ с аллендроновой кислотой (АЛН) синтезировали двумя способами: в растворе и на твердом носителе — сорбенте гидроксилапатите (ГАП), с помощью сшивающих агентов: (1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимида (EDC), сульфосукцинмидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилата (Sulfo-SCMM) и глутарового альдегида (GLT).

Электрофоретический анализ конъюгатов рчГМ-КСФ с АЛН, полученных при синтезе в растворе, показал, что молекулярная масса рчГМ-КСФ в составе конъюгатов соответствует молекулярной массе исходного белка (15100 ± 200) Да. Синтез конъюгатов происходит с образованием мономерной формы рчГМ-КСФ, димера с молекулярной массой в области 31200 Да и тримера — 51000 Да.

При получении конъюгатов белка рчГМ-КСФ с АЛН с помощью EDC, Sulfo-SMCC и GLT методом твердофазного синтеза, не связанный с бисфосфонатом белок элюировался с ГАП раствором фосфорнокислого калия (КФ) при концентрации 0,2 моль/л. Конъюгаты элюировались раствором КФ при концентрации 0,8 моль/л.

Таким образом, в результате проведенного исследования получены образцы конъюгатов рчГМ-КСФ с алендроновой кислотой, которые имеют повышенное сродство к костному матриксу и могут быть использованы при разработке средств для таргетной доставки.

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА СИНТЕЗА БИОКОНЬЮГАТОВ
НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ
ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ЯМР-АНАЛИЗА***

**DEVELOPMENT OF SYNTHESIS METHOD OF BIOCONJUGATES
BASED ON MAGNETIC NANOPARTICLES FOR SOLID-PHASE
NMR-BASED ASSAY**

М. Д. Кропанева¹, П. В. Храмцов^{1,2}, М. С. Бочкова¹,
В. П. Тимганова¹, С. А. Заморина^{1,2}, М. Б. Раев^{1,2}

¹ *Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской Академии наук,
«ИЭГМ УрО РАН», г. Пермь, Россия*

² *ФГБОУ ВПО Пермский государственный национальный
исследовательский университет, г. Пермь, Россия*

M. D. Kropaneva¹, P. V. Khramtsov^{1,2}, V. P. Timganova¹,
M. S. Bochkova¹, S. A. Zamorina^{1,2}, M. B. Rayev^{1,2}

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms
of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

² *Perm State National Research University, Perm, Russia*

Аннотация

Данное исследование посвящено разработке стабильных суспензий магнитных наночастиц, функционализированных моноклональными антителами и стрептавидином для твердофазного ЯМР-анализа. В ходе работы была оптимизирована процедура синтеза и продемонстрирована возможность контроля размеров магнитных наночастиц, средний диаметр которых составлял от 100 до 180 нм. Была показана применимость полученных конъюгатов в твердофазном ЯМР-анализе. В ходе месяца хранения при температуре +4 °С структурные свойства конъюгатов не изменялись.

Abstract

This research is focused on the development of stable suspensions of magnetic nanoparticles, functionalized with monoclonal antibodies and streptavidin for solid-phase NMR-based assay. In the course of this work the procedure of synthesis has been optimized and the possibility of magnetic nanoparticles size control has been demonstrated. The mean

© М. Д. Кропанева, П. В. Храмцов, М. С. Бочкова, В. П. Тимганова, С. А. Заморина, М. Б. Раев, 2018.

* Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №17-15-01116).

diameter of nanoparticles was from 100 to 180 nm. The applicability of the conjugates in solid-phase NMR- based assay was shown. Structural properties of the conjugates were not changing during the month of storage at the temperature of + 4 °C.

Введение

Конъюгат, если рассматривать это понятие в контексте *in vitro* диагностики, — это искусственно синтезированный комплекс, состоящий из распознающих элементов, способных к специфическому взаимодействию с мишенью и метки, поставляющей сигнал, который можно детектировать при помощи специального оборудования или визуально.

В данном исследовании в качестве метки использовались магнитные наночастицы, а сигналом являлось изменение времени спин-спиновой (поперечной) релаксации протонов (T_2). Если поместить протоны в магнитное поле и воздействовать на них радиочастотным импульсом их векторы намагниченности будут вращаться в одной фазе. Далее постепенно происходит смещение фаз вращения вектора намагниченности протонов, так, что в конце концов векторы всех протонов будут двигаться в разных фазах. Этот процесс и называется спин-спиновой релаксацией, а время необходимое для дефазировки 37 % протонов — T_2 . Принцип анализов, использующих данное явление, основан на том, что при наличии в среде магнитных наночастиц время T_2 будет изменяться [1]. Применительно к нашей работе данный принцип осуществляется следующим образом. При связывании магнитных наночастиц с мишенью они не удаляются из среды в процессе промывки и время релаксации протонов T_2 снижается.

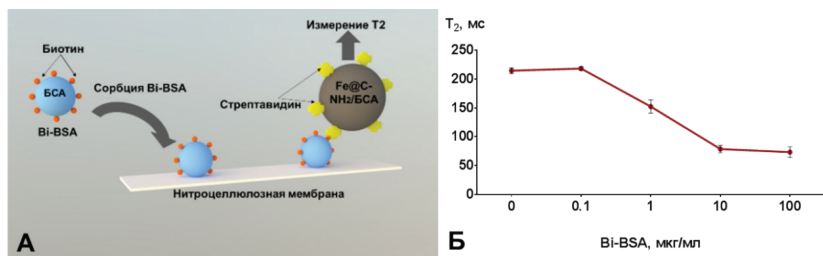
Магнитные наночастицы могут быть широко использованы в *in vivo* визуализации, адресной доставке лекарственных средств, *in vitro* диагностике, в том числе и в анализах, основанных на ЯМР-релаксометрии. Однако для применения биоконъюгатов на основе наночастиц в реальной лабораторной практике важными являются их стабильность, сроки и условия хранения [2]. Все эти параметры в конечном итоге определяют успех применения таких биоконъюгатов, и это необходимо учитывать при их разработке.

Таким образом, цель данной работы разработать метод синтеза стабильных конъюгатов железных наночастиц, инкапсулированных углеродом (Fe@C), с распознающими молекулами для применения в твердофазном ЯМР-анализе.

Материалы и методы

В работе использовали аминированные железные наночастицы, покрытые углеродом (Fe@C-NH_2). Аминирование осуществляли согласно методике, описанной в статье [3]. Далее полученные суспензии использовали

для создания конъюгатов магнитных наночастиц с распознающими молекулами. Принцип синтеза конъюгатов заключался в следующем. На поверхность $\text{Fe}@C\text{-NH}_2$ сорбировали бычий сывороточный альбумин (БСА). Далее наночастицы $\text{Fe}@C\text{-NH}_2/\text{БСА}$ обрабатывали раствором глутаральдегида, молекулы которого осуществляли поперечную сшивку молекул БСА на поверхности наночастиц и предоставляли свободные альдегидные группы, к которым ковалентно пришивали распознающие молекулы: моноклональные антитела или стрептавидин. Структурные свойства (диаметр, индекс полидисперсности) конъюгатов оценивали при помощи обратного динамического светорассеяния. Функциональную активность конъюгатов подтверждали методом твердофазного ЯМР-анализа следующим образом (см. рисунок, А). На полоски из нитроцеллюлозной мембраны с размером пор 8 мкм сорбировали биотинилированный БСА или белок G в различных концентрациях. Полоски высушивали 15 мин при комнатной температуре, затем полчаса при $+37^\circ\text{C}$, после чего их помещали в пластиковые планшеты, в которых проводили все дальнейшие процедуры. Полоски трехкратно промывали забуференным фосфатами физраствором с твином–20 (ЗФРТ), блокировали 1 % БСА в ЗФРТ в течение часа при $+37^\circ\text{C}$, затем вновь промывали и вносили в лунки суспензию $\text{Fe}@C\text{-NH}_2/\text{БСА}$, функционализированных стрептавидином или моноклональными антителами. Спустя 60 мин полоски промывали и проводили измерение времени релаксации протонов при помощи портативного ЯМР-релаксметра.



Твердофазный ЯМР-анализ:

А — схема твердофазного ЯМР-анализа;

Б — Результаты измерений времени релаксации,

T_2 (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение, $n = 3$)

Результаты

В ходе исследований была оптимизирована процедура синтеза биоконъюгатов, продемонстрирована возможность контроля размеров магнитных

железоуглеродных наночастиц путем изменения pH среды, в которой происходила сорбция молекул БСА на поверхность наночастиц; и массового отношения БСА:магнитные наночастицы. Средний размер функционализированных распознающими молекулами наночастиц составлял от 100 до 180 нм. Была показана применимость полученных конъюгатов в твердофазном ЯМР-анализе (см. рисунок, *Б*). В ходе месяца хранения при температуре +4 °C структурные свойства конъюгатов не изменялись.

Заключение

Разработан метод синтеза биоконъюгатов железных наночастиц, инкапсулированных углеродом, с распознающими молекулами, который может быть успешно использован в твердофазном ЯМР-анализе.

Литература

1. Alcantara D. Iron oxide nanoparticles as magnetic relaxation switching (MRSw) sensors: Current applications in nanomedicine // *Nanomedicine: NBM*. 2016. V. 12. С.1253–1262.
2. Laurentius L. B., Owens N. A., Park J, Crawford A. C. & Porter M. D. Advantages and limitations of nanoparticle labeling for early diagnosis of infection // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2016. V. 16, С. 883–895.
3. Grass R. N., Athanassiou E. K., Stark W. J. Covalently Functionalized Cobalt Nanoparticles as a Platform for Magnetic Separations in Organic Synthesis // *Angewandte Chemie — International Edition*. 2007. V. 46. С. 4909–4912.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИСТОНОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДНК В КЛЕТКИ ОПУХОЛЕВОЙ СТРОМЫ*

A DESIGN OF RECOMBINANT HISTONES FOR DNA DELIVERY TO STROMAL CELLS OF TUMOR

А. И. Кузьмич¹, О. А. Ракитина², Д. А. Дидыч³

¹ ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН

² ФГБОУВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

³ ФГБУН Институт биоорганической химии РАН

A.I. Kuzmich, *Institute of Molecular Genetics RAS, Russia*

O.A. Rakitina, *Lomonosov Moscow State University, Russia*

D.A. Didych, *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Russia*

E-mail: akrubik@gmail.com

Аннотация

Одним из перспективных подходов к лечению рака является генная терапия. Для доставки ДНК в клетки могут использоваться некоторые белки и пептиды, в частности гистоны, способные неспецифически взаимодействовать с отрицательно заряженной клеточной мембраной. Для многих невирусных систем показано усиление эффективности доставки за счет включения в их состав лигандов, способных селективно связываться с рецепторами, представленными на поверхности целевых клеток. Такой мишенью могут быть поверхностные белки стромальных клеток опухоли. Одним из ключевых элементов опухолевой стромы являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ). Эти клетки отличаются наличием на своей поверхности ряда белковых молекул, что делает их хорошей мишенью для доставки терапевтических генов невирусными носителями, содержащими лиганды специфичные к данным маркерам. Среди хорошо изученных маркеров — белки FAP и PDGFRb, для которых найдены селективные лиганды белковой природы. Мы предполагаем, что армирование гистонов FAP- или PDGFRb-связывающим доменом, способно обеспечить эффективную доставку ДНК в ОАФ. Целью данной работы было получение рекомбинантного гистона H2A человека, слитого с лигандом к белку FAP или PDGFRb.

© А. И. Кузьмич, О. А. Ракитина, Д. А. Дидыч, 2018.

* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00852.

Abstract

Gene therapy is one of the promising approaches to the treatment of cancer. Some proteins and peptides may be used to deliver DNA to cells, in particular histones capable of interacting nonspecifically with a negatively charged cell membrane. The effectiveness of gene delivery system is shown to be enhanced by including in their composition ligands that are able to selectively bind to receptors present on the surface of the target cells. Such a target may be surface proteins of tumor stromal cells. One of the key elements of the tumor stroma are tumor-associated fibroblasts (TAF). These cells are distinguished by the presence on their surface of a number of protein molecules, which makes them a good target for the delivery of therapeutic genes by non-viral carriers containing ligands specific to these markers. Among the well-studied markers are the proteins FAP and PDGFRb, for which selective ligands of protein nature have been found. We propose that histone armed by a FAP or PDGFRb binding domain is able to provide efficient DNA delivery to the TAF. The aim of this work is production of a recombinant human histone H2A fused to ligand for a FAP or PDGFRb protein.

Селективное связывание комплексов носитель-ДНК с какими-либо молекулами на поверхности целевых клеток, запускающее интернализацию генетического материала внутрь клеток, способно существенно увеличивать эффективность трансфекции (т. е. уровень продукции доставленного гена) целевых клеток (Durymanov et al. Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue. *Biomaterials*. 2013 Dec;34(38):10209-16). Мы предполагаем, что армирование гистона H2A лигандами, специфично связывающимися с белками на поверхности ОАФ, может значительно увеличить эффективность доставки ДНК в ОАФ таким гибридным носителем. В ходе анализа литературы мы выделили две перспективные мишени на поверхности ОАФ — белки FAP и PDGFRb.

FAP — белок активации фибробластов — сериновая протеаза, представленная на цитоплазматической мембране. Для ОАФ высоко специфична экспрессия белка активации фибробластов (FAP). В серии экспериментов с использованием человеческих тканей, FAP был обнаружен в строме более 90 % типов злокачественных опухолей, при этом показано, что для FAP характерна экспрессия при эмбриональном развитии, и он практически не детектируется в большинстве нормальных тканей. На основе антител разработано несколько лигандов, селективно связывающихся с FAP и способных доставлять различные терапевтические молекулы к ОАФ: наночастицы с фактором некроза опухоли TNF, радиоизотопы, бактериальные токсины. Из всех FAP лигандов наиболее перспективным видится мини-антитело к FAP ESC11. Данное одноцепочечное антитело было описано в работе (Fischer et al. Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly internalizing antibodies. *Clin Cancer Res*. 2012 Nov 15;18(22):6208-18).

Оно было способно селективно связываться с FAP на поверхности клеток с последующей быстрой интернализацией внутрь, что может быть очень важно для направленной доставки генных препаратов в ОАФ.

Другая мишень, белок PDGFRb, представляет собой рецептор тромбоцитарного фактора роста бета-типа. Содержание этого трансмембранного белка часто увеличивается на поверхности опухолевых стромальных клеток таких, как ОАФ и перициты. Известно множество лигандов, связывающихся с PDGFRb, при этом многие из них представляют собой линейные и циклические пептиды. Такие лиганды обладают более простой структурой по сравнению с мини-антителами и более просты в производстве. Данные лиганды также использовались для доставки цитотоксических белков и радиоизотопов в строму опухоли. Нами был выбран линейный пептид уG2, способный связываться с PDGFRb+ клетками и интернализываться внутрь (Marr et al. Peptide arrays for development of PDGFR β Affine molecules. *Mol Imaging Biol.* 2013 Aug;15(4):391-400).

Нами была получена последовательность, кодирующая гистон H2A, содержащий на N-конце мини-антитело к FAP ESC11. Также была получена последовательность, кодирующая гистон H2A, несущий последовательность пептида уG2 на C-конце. Данные последовательности были клонированы в вектора рЕТ для продукции рекомбинантных белков в бактериальной системе.

Была проведена работа по подбору условий продукции белка ESC11-H2A в бактериях. В ходе работы данный белок нарабатывался в цитоплазме либо в периплазматическом пространстве клеток. К сожалению, уровень продукции ESC11-H2A был крайне низким, следовые количества целевого белка в продуцирующих клетках выявлялись только с помощью вестерн-блота. По-видимому, бактериальная система не подходит для синтеза такого белка, что может быть связано с его значительной молекулярной массой.

Белок H2A-уG2 хорошо синтезировался в цитоплазме продуцирующих его бактерий. Нами были подобраны условия его экспрессии, при которых клетки накапливали его в количестве, сопоставимом с немодифицированным гистоном H2A. С помощью ионообменной хроматографии удалось получить практически чистый рекомбинантный белок H2A-уG2 (степень чистоты не менее 80 %), при этом выход белка составил около 5 мг с литра бактериальной культуры. Далее планируется вторая стадия очистки с помощью обращено-фазовой хроматографии, которая в случае рекомбинантного гистона H2A позволяет получить высокочистый препарат. В случае успеха будет изучена способность белка H2A-уG2 связываться с поверхностью PDGFRb+ клеток и обеспечивать доставку ДНК в них.

Таким образом, в ходе работы нам удалось подобрать условия продукции в бактериальной системе и последующей очистки нового рекомбинантного гистона H2A слитого с пептидным лигандом к PDGFR β белку. В то же время обнаружилось, что бактериальная система плохо подходит для продукции гистона H2A слитого с мини-антителом к белку FAP.

Литература

1. Durymanov M. O., Slastnikova T. A., Kuzmich A. I., Khramtsov Y. V., Ulasov A. V., Rosenkranz A. A., Egorov S. Y., Sverdlov E. D., Sobolev A. S. Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue. *Biomaterials*. 2013 Dec;34(38):10209-16).
2. Fischer E, Chaitanya K, Wüest T, Wadle A, Scott AM, van den Broek M, Schibli R, Bauer S, Renner C. Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly internalizing antibodies. *Clin Cancer Res*. 2012 Nov 15;18(22):6208-18.
3. Marr A, Nissen F, Maisch D, Altmann A, Rana S, Debus J, Huber PE, Haberkorn U, Askoxyllakis V. Peptide arrays for development of PDGFR β Affine molecules. *Mol Imaging Biol*. 2013 Aug;15(4):391-400.

**ИЗУЧЕНИЕ ПУТЕЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА
В *GEOBACILLUS ICIGIANUS* НА ОСНОВЕ
МЕТОДА ПОТОКОВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ**

**GENOME-SCALE MODELING OF CARBON ASSIMILATION
IN *GEOBACILLUS ICIGIANUS***

М. А. Куляшов^{1,2}, И. Р. Акбердин², А. С. Розанов¹, С. Е. Пельтек¹

¹ *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

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

M. A. Kulyashov^{1,2}, I. R. Akberdin², A. S. Rozanov¹, S. E. Peltek¹

¹ *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk National Research University, Novosibirsk, Russia*

E-mail: m.kulyashov@mail.ru

Аннотация

В последнее десятилетие моделирование генома стало одним из важнейших и полезных инструментом для исследования бактериального метаболизма на уровне целой клетки. Для модельных видов, таких как *E. Coli* и *B.Subtilis*, существует огромное количество экспериментальных данных по различным иерархическим уровням клеточной организации, что является основой для наиболее детальной и полной реконструкции метаболизма организма, в то время, как прогресс в развитии высокопроизводительных методов и теоретических подходах позволяет проводить исследование внутриклеточного метаболизма для немодельных бактериальных видов. В данной работе мы представляем недавно полученные теоретические и экспериментальные данные для *Geobacillus icigianus*, термофильной бактерии, изолированной в горячем источнике и геном которой был секвенирован в ИЦиГ СО РАН три года назад.

Abstract

In the last decade, genome-scale modeling became a powerful and useful tool to investigate whole-cell microbial metabolism. For model microbes, such as *E. coli*, a huge amount of experimental data on different hierarchical levels of cellular organization is a basis for the most detailed and complete metabolic reconstruction of the organism, while advances in high-throughput techniques and in theoretical approaches pave the way to explore metabolic potential of the organism for non-model microbial species. Here, we

represent recently obtained theoretical and experimental results for *Geobacillus icigianus*, a thermophilic bacterium isolated from a hot spring 3 years ago.

Материалы и методы

G. icigianus культивировали в условиях биореактора при pH = 7 с постоянной скоростью подачи воздуха равной 1 литр воздуха на 1 литр раствора в минуту и в микробиологических шейкерах — инкубаторах при pH = 8. Измерения роста культуры производились с использованием спектрофотометра PE 5400 в 1 мл пластиковой кюветы для измерения культуры из шейкера — инкубатора и 10 мл стеклянной кюветы для измерения культуры из биореактора. Чтобы построить полногеномную модель данной бактерии и проводить последующий анализ, мы использовали секвенированный геном [NZ_JPYA00000000.1] и набор программных средств: KBase и MOST.

Результаты

Нами была построена полногеномная потоковая модель на основе секвенированного генома *G. icigianus*, которая включает на данный момент в себя 1310 генов, а также 1585 метаболита и 1547 метаболических реакции. Разработанная модель имеет наибольшее покрытие генома и включает больше ферментативных реакций и метаболических путей, чем опубликованные ранее модели представителей рода *Geobacillus* (см. таблицу).

Сравнение потоковых полногеномных моделей для рода *Geobacillus*

Объект	Общее количество генов	Общее количество метаболических реакций	Общее количество уникальных метаболитов
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (C56-YS93)	736	1159	1163
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (NCIMB 11955)	859	1011	1050
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i> (M10EXG)	—	1075	760
<i>Geobacillus icigianus</i> (G1W1)	1310	1547	1585

Проведенные эксперименты *in silico* позволили выявить, что при культивировании на глюкозе в качестве единственного источника углерода на

бедной среде, основными метаболическими путями являются гликолиз, пентозофосфатный путь, ЦТК, синтез пуринов и пиримидинов, а также ряд анаплеротических реакции. Также мы предсказали скорость роста на глюкозе в качестве субстрата, которая составила $0,66 \text{ ч}^{-1}$.

Мы провели эксперименты по выращиванию *G. icigianus* на различных субстратах и в разных условиях. В результате было показано, что наиболее эффективными для культивирования являются субстраты: глюкоза и глицерин (рис. 1), а также оптимальные условия для роста культуры: температура — 62°C и $\text{pH} = 7$ (рис. 2).

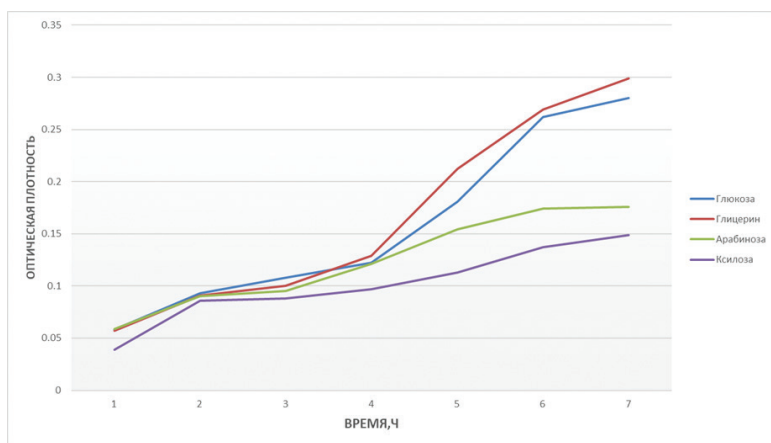


Рис. 1. Определение оптимального субстрата

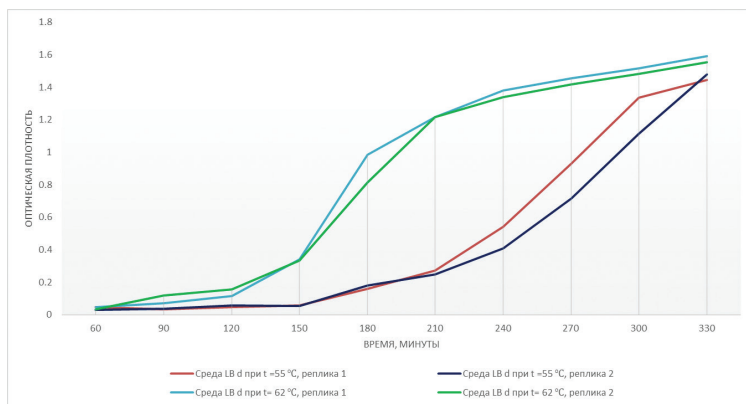


Рис. 2. Определение оптимальной температуры

Темп роста в экспериментах с биореактором был равен $0,5 \text{ ч}^{-1}$ (рис. 3), тогда как теоретически предсказанное значение скорости роста составляло $0,66 \text{ ч}^{-1}$.

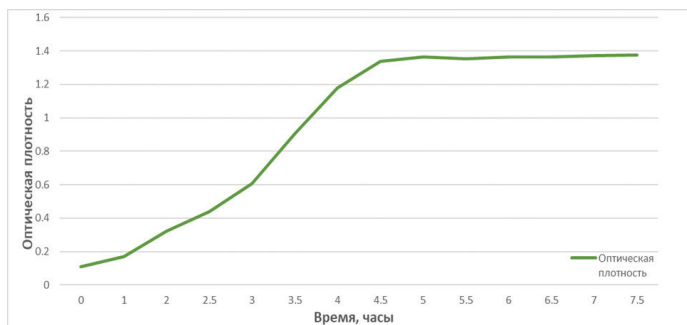


Рис. 3. Рост культуры в биореакторе

Выводы

Первоначальные результаты позволили нам определить оптимальные параметры роста, которые будут способствовать дальнейшим экспериментам, а также показали, что разработанная полногеномная модель качественно соответствует данным, наблюдаемым в экспериментах.

**ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ
МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА
НА ДНЕ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ ***

**ESTIMATION OF THE APPLICATION OF A MICROBIAL FUEL CELL
AT THE BOTTOM OF THE COASTAL ZONE
OF THE BLACK SEA**

А. А. Лазукин¹, Н. Н. Волченко¹, А. А. Самков¹,
Д. С. Тисленко², А. С. Архипова³

¹ *ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»*

² *ФГБОУ ВО «Московский политехнический университет»*

³ *ОГБУ ДО «Дворец творчества детей и молодежи»*

A. A. Lazukin, N. N. Volchenko, A. A. Samkov, *KubSU, Russia*

D. S. Tislenko, *MPU, Russia*

A. S. Arkhipova, *GBOU DOD, Russia*

E-mail: lazukin1996@mail.ru, volchenko.n@mail.ru

Аннотация

Показана возможность использования микробного топливного элемента на дне прибрежной зоны Черного моря в окрестностях Сочи.

Abstract

Was shown potential of using microbial fuel cell at the bottom of the Black Sea in the vicinity of Sochi.

Микробный топливный элемент (МТЭ) — биотехнологическое устройство, позволяющее преобразовывать энергию химических связей органических веществ в электрическую посредством микроорганизмов. Электрогенные микроорганизмы находятся в анодной камере, в которой поддерживаются анаэробные условия. Катод находится в катодной камере, в анаэробных условиях. Принцип работы заключается в «отрыве» микроорганизмами электронов от субстрата питания и передачи их на анод, который выполняет роль акцептора электронов. Электроны начинают движение от анода к ка-

© А. А. Лазукин, Н. Н. Волченко, А. А. Самков, Д. С. Тисленко, А. С. Архипова, 2018.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края (проект № 16-44-230908 p_a).

тоту, под действием разности окислительно- восстановительного потенциала. На катоде происходит восстановление кислорода с образованием воды. Одновременно с отрывом электронов от субстрата происходит образование протонов водорода, которые проходят через ионно-селективную мембрану из анодной камеры в катодную, где и соединяются с кислородом с образованием воды (Дебабов, 2008).

В настоящее время все более остро стоят вопросы о целесообразности масштабного экологического мониторинга как в городах, так и на водных объектах, с целью информационной поддержки различных управленческих решений, охраны и оздоровления окружающей среды, интеграции полученной информации в различные ведомства (Абрамова и др., 2012). Данная концепция предусматривает использование автоматизированных систем экологического контроля, которые могли бы производить замеры благодаря наличию специальных измерительных устройств и датчиков и затем передавать информацию в центр обработки информации. Однако, использование подобных систем несет определенные риски, связанные с опасностью вандализма. При этом фактором, провоцирующим интерес у вандалов, становятся солнечные элементы питания, которые демаскируют приборы. (Шубин, Тихомиров, 2003) Становится понятно, что использование автоматизированных комплексов экологического мониторинга ограничивается сроком работы элементов питания и малой защищенностью от воров и вандалов.

Цель работы состояла в изучении возможности использования микробных топливных элементов в водах черного моря на малой глубине (6 метров). Актуальность подобного исследования заключается в необходимости поиска альтернативных источников энергии для автоматизированных станций экологического мониторинга. Ранее в Кубанском госуниверситете уже была показана возможность использования МТЭ для генерации электричества (Volchenko et. al., 2013).

Исследование было проведено в рамках проектной сметы ОЦ Сирию летом 2018 г. Для исследования были сконструированы микробные топливные элементы бентосного типа. Данные МТЭ отличаются отсутствием протон-селективной мембраны и наличием открытого взаимодействия с окружающей средой. Данная особенность является ключевой в вопросах выбора МТЭ именно бентосного типа, так как позволяет производить генерацию энергии в непрерывном режиме, используя только диффундирующие из окружающей среды органические вещества [Batteryless, WrielsSensor ..., 2008].

В эксперименте исследовалась работа двух одинаковых МТЭ. Электроды были изготовлены из углеродного войлока марки НТМ-200М, Анод представлял собой плоский отрезок войлока в виде прямоугольника со сто-

ронами 10 на 15 см, при этом толщина войлока составляла 0,5 см. Катод был выполнен в виде квадрата со сторонами 5 см. Оба электрода были армированы пластиковой сеткой «Protect», обычно используемой для заграждений на садовых участках. Оба электрода были расположены вертикально друг над другом. Фиксация электродов была осуществлена таким образом, что электроды были разнесены на 15 см друг от друга.

Фиксация результатов производилась посредством микроконтроллера ArduinoUNOV3.0. Микроконтроллер измерял электрогенез МТЭ и производил запись данных на CD карту. Между электродами МТЭ был параллельно замкнут резистор 0,25 Вт 1 КОм. Таким образом, обеспечена возможность произвести расчеты мощности согласно формуле

$$W = U^2/R,$$

где W — мощность (Вт), U — напряжение (В), R — сопротивление (Ом).

Запись напряжения производилась с периодом в 30 минут. Эксперимент продолжался на протяжении 44 часов. Микроконтроллер оборудован 10-битным аналого-цифровым преобразователем. Опорное напряжение АЦП было установлено на 1,1 В, что дало возможность измерять напряжение с шагом 0,001 В.

Питание микроконтроллера производилось от литий-ионных аккумуляторов общей емкостью 6000 mAh. Микроконтроллер и аккумулятор были собраны в специальной плавучей герметичной камере, которая располагалась в воде на расстоянии от поверхности 1 метр. Связь с МТЭ происходила посредством электрического провода длиной 5 метров. Микробные топливные элементы были установлены на дне шельфовой зоны, на берегу пляжа, принадлежащему ОЦ Сириус. Глубина составила 6 метров, температура воды колебалась вблизи 26 градусов. Динамика напряжения приведена на рисунке.

Исследование показало возможность генерации слабого электрического тока (см. рисунок) Напряжение под нагрузкой поднималось до 292 мВ для МТЭ 2 и до 274 мВ для МТЭ 1, что соответствует мощности 85 мкВт и 75 мкВт соответственно. Примечательно, что МТЭ 1 в середине эксперимента вышел из строя. Вероятно, это произошло по причине механического повреждения, вызванного подводными волнениями.

Таким образом было экспериментально подтверждена возможность генерации электрического тока посредством МТЭ в шельфовой зоне Черного моря. Были достигнуты мощности в 85 и 75 мкВт, что может быть достаточно для обеспечения энергией маломощных процессоров в различных «ждущих схемах» (Wang, Park, Ren, 2015). Так, напряжение может усиливаться посредством сверхнизковольтных преобразователей, запастись в ио-

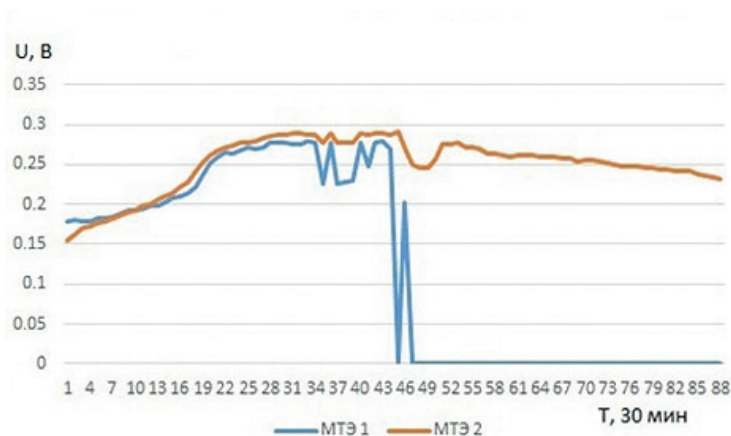


График электрогенеза МТЭ 1 и МТЭ 2

нистрах и по достижении определенного заряда выводить процессоры из спящего режима для совершения полезной работы. Таким образом, МТЭ является перспективным источником питания для маломощных автономных устройств, удовлетворяющим условиям скрытности и практически неограниченной по времени генерацией электрической энергии.

Литература

1. Дебатов В. Г. Производство электричества микроорганизмами // Микробиология. 2008, Т. 7, № 2, С. 149–157
2. Системный подход к разработке концепции экологического мониторинга промышленных городов / Абрамова А. Г., Пугогаренко Н. К., Петров В. В., Маркина А. В. // Инженерный вестник Дона. 2012. №4–2 (23). С. 1
3. Шубин И. Л., Тихомиров Л. А. Шумозащитные экраны с интегрированными солнечными батареями // Вестник МГСУ. 2011. № 3–1. С. 103–106.
4. Volchenko N., Khudokormov A., Samkov A., Karasev S., Veselovskaya M., Kalashnikov A., Karaseva E. Environmental biotechnology and bio-energy studies in Kuban State University // В сборнике: PRADEC Interdisciplinary Conference Proceedings. 2013. С. 107–111.
5. Batteryless, Wireless Sensor Powered by a Sediment Microbial Fuel Cell / Conrad Donovan [et al.] // *Environment. Science. Technology*. 2008. № 42. P. 8591–8596.

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ
НА СКОРОСТЬ ПОТРЕБЛЕНИЯ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ
КИСЛОТ ТЕРМОФИЛЬНЫМ МЕТАНОГЕННЫМ
СООБЩЕСТВОМ МИКРООРГАНИЗМОВ ***

EFFECT OF CONDUCTING MATERIALS ON THE SPEED
OF VOLATILE FATTY ACIDS DEGRADATION
BY THERMOPHILIC METHANOGENIC COMMUNITY

Ю. В. Литти¹, Ю. И. Русскова¹, Н. А. Чернова¹,
А. Н. Ножевникова¹, Э. Р. Михеева²

¹ *ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН*

² *ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет
им. Н. И. Лобачевского»*

Yu. V. Litti¹, Yu. I. Russkova¹, N. A. Chernova¹,
A. N. Nozhevnikova¹, E. R. Mikheeva²

¹ *Research Center of Biotechnology RAS, Russia*

² *Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Russia*

E-mail: litty-yuriy@mail.ru

Аннотация

Прямой межвидовой перенос электронов (DIET) — это недавно открытый анаэробный синтрофный процесс, в котором микроорганизмы обмениваются электронами напрямую от клетки к клетке без использования восстановленных молекул (водород, формиат). Скорость передачи электронов с помощью DIET может быть почти на порядок выше, чем при других синтрофных процессах, что способствует более быстрому и полному разложению органического вещества. В анаэробных реакторах, перерабатывающих различные органические отходы, стимулировать DIET можно путем внесения кондуктивных материалов. В работе исследовано влияние кондуктивных материалов: магнетита, карбоновой ткани и гранулированного угля на скорость потребления летучих жирных кислот метаногенным сообществом микроорганизмов в термофильных условиях.

© Ю. В. Литти, Ю. И. Русскова, Н. А. Чернова, А. Н. Ножевникова, Э. Р. Михеева, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-38-00275.

Abstract

Direct interspecies electron transport (DIET) is a newly discovered anaerobic syntrophic interaction in which microorganisms exchange electrons directly from cell to cell without using reduced molecules (hydrogen, formate). DIET mediated electron transport rate can be almost an order of magnitude higher than in other syntrophic interactions, which promotes faster and more complete decomposition of organic matter. In anaerobic reactors processing various organic waste, DIET can be stimulated by the introduction of conductive materials. Present work studies the effect of conductive materials: magnetite, carbon cloth and granular activated carbon on the rate of consumption of volatile fatty acids by the methanogenic microbial community under thermophilic conditions.

Деструкция органического вещества в анаэробных условиях представляет собой многостадийный процесс. На синтрофной (ацетогенной) стадии происходит окисление летучих жирных кислот (ЛЖК) и спиртов синтрофными бактериями с образованием ацетата, водорода и углекислого газа. В связи с низкими скоростями синтрофную стадию считают одной из двух основных лимитирующих скорость анаэробного разложения органического вещества стадий (вторая — стадия гидролиза). В высокопроизводительных анаэробных реакторах велика вероятность чрезмерного накопления ЛЖК, которые при превышении определенной концентрации обладают ингибирующим воздействием на метаногенное микробное сообщество, что приводит к снижению скорости процесса метаногенеза, вплоть до его полной остановки.

На пике интереса у зарубежных исследователей метаногенеза и разрабатчиков анаэробных реакторов в настоящее время находятся результаты исследований, посвященных изучению процесса прямого межвидового переноса электронов (DIET, direct interspecies electron transfer). Показано, что добавление разных электропроводящих материалов может ускорить считающийся «узким» местом метаногенеза межвидовой обмен электронами. В большинстве случаев, такие исследования проводились в мезофильных условиях, с концентрациями ЛЖК, суммарно не превышающими 1–2 г/л. В то же время, режимы работы высокопроизводительных реакторов предполагают использование термофильных условий и накопление в сбрасываемой среде ЛЖК до 3–4 г/л и выше. Поэтому, целью настоящей работы было исследовать влияние кондуктивных материалов (КМ) разной природы (магнетита, карбоновой ткани, гранулированного угля) на скорость разложения ЛЖК в высоких концентрациях метаногенным микробным сообществом в термофильных условиях.

В качестве источника метаногенного микробного сообщества были использованы термофильный анаэробно сброженный осадок сточных вод

Курьяновских очистных сооружений (г. Москва) и эфлюент высокопроизводительных экспериментальных термофильных реакторов ($V=100\text{ л}$), сбрасывающих модельную органическую фракцию твердых бытовых отходов. Субстратом служили индивидуальные ЛЖК (ацетат, пропионат, бутират), либо их смесь. В качестве материалов, способных стимулировать DIET, использовали гранулированный уголь, карбоновую ткань и магнетит ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$). В качестве контролей служил инокулят с и без добавления ЛЖК. Эксперименты проводили во флаконах объемом 120 мл, в анаэробных условиях при 55°C . В ходе экспериментов регулярно измеряли содержание H_2 , CH_4 и CO_2 в газовой фазе, а также pH и ЛЖК в жидкой фазе. Все эксперименты проводили в 3-х повторностях.

Из рис. 1 и 2 видно, что добавление даже малых количеств КМ (угля и магнетита) значительно снижало лаг-фазу и увеличивало скорость образования метана и потребления смеси летучих жирных кислот. Из рис. 1 видно, что из добавленной смеси ЛЖК в первую очередь начиналось потребление ацетата, прямого предшественника метана. Далее шло синтрофное разложение бутирата и только после его истощения, начиналось потребление пропионата. Это согласуется с данными о более медленном метаболизме пропионата в большинстве анаэробных реакторах, и о том, что его накопление свидетельствует о нестабильности процесса. Нами отмечено, что скорость потребления пропионата прямо коррелировала с количеством добавленного кондуктивного материала (рис. 1). При этом разложение ЛЖК в опытах с наиболее низ-

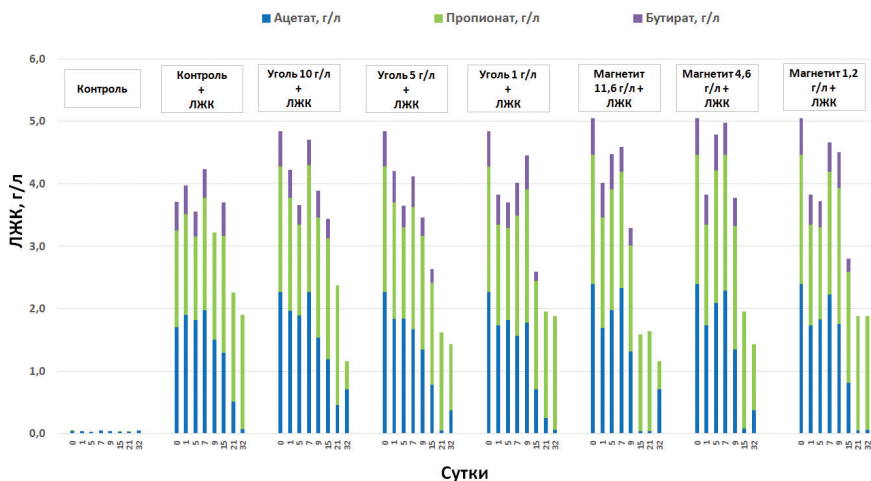


Рис. 1. Динамика разложения ЛЖК метаногенным микробным сообществом при добавлении разных количеств гранулированного угля и магнетита

кими концентрациями КМ практически не отличалось от контроля (без КМ). Закономерности в потреблении ЛЖК и образования метана соблюдались не полностью. Например, наибольшая скорость образования метана наблюдалась в опытах со средними концентрациями КМ, т. е. при добавлении 4,6 г/л магнетита и 5 г/л угля. Однако при сравнении этих двух КМ можно отметить, что количество образующегося метана при добавлении магнетита в концентрации 11,6 и 4,6 г/л было на 30 % выше, чем при добавлении сопоставимых количеств угля. Это объясняется, в том числе и тем, что содержание метана в образующемся биогазе при добавлении магнетита и угля, составляло, соответственно 80 % и 72 %, соответственно. Таким образом, при сопоставимой скорости потребления ЛЖК, использование магнетита на практике более предпочтительно из-за более высокой энергетической ценности образующегося биогаза.

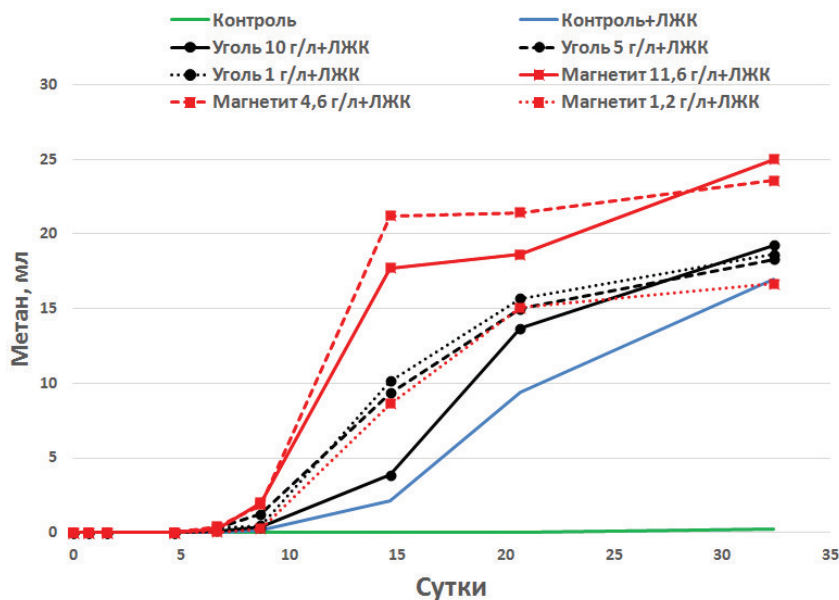


Рис. 2. Динамика образования метана из ЛЖК метаногенным микробным сообществом при добавлении разных количеств гранулированного угля и магнетита

В экспериментах с добавлением индивидуальных ЛЖК (пропионат, бутират) показано, что концентрация магнетита в концентрации 1,2–11,6 г/л пропорционально влияет на увеличение скорости анаэробного разложения

бутирата, в то время как добавление гранулированного угля или угольной ткани не ведет к линейной зависимости выхода биогаза от концентрации КМ данной природы. Продолжается работа по подбору концентрации магнетита для оптимального контролируемого анаэробного разложения бутирата. Ускоренное разложение пропионата наблюдалось в присутствии магнетита с концентрацией 4,6 г/л, при отсутствии стимулирующего эффекта угольной ткани на биodeградацию пропионата. Получены анаэробные накопительные культуры, активно разлагающие бутират, пропионат и смесь ЛЖК в присутствии КМ, в дальнейшем планируется изучение состава данных микробных сообществ молекулярными методами.

**ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА ГИСТОНА H1
И ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ
КРОВИ БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ
В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ***

FEATURES HYDROLYSIS OF H1 HYSTONE AND MYELINE BASIC
PROTEIN BY IMMUNOGLOBULINS
FROM THE BLOOD OF HIV-INFECTION PATIENTS
IN PATHOGENESIS OF DISEASE

Н. А. Мальцева^{1,2}, И. Ю. Компанец², С. В. Баранова²

¹ *ФГБОУ ВО Новосибирский Государственный
Педагогический Университет*

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

N. A. Maltseva, *NSPU, SB RAS ICBFM, Novosibirsk, Russia*

I. Y. Kompaneets, *SB RAS ICBFM, Novosibirsk, Russia*

S. V. Baranova, *SB RAS ICBFM, Novosibirsk, Russia*

Аннотация

Аутоантитела с ферментативной активностью (абзимы) являются отличительной чертой аутоиммунных и некоторых вирусных заболеваний. Сходство некоторых белков человека и вируса — это один из факторов сбоя иммунной системы. В организме сначала вырабатываются антитела против белков вируса, а затем иммунная система перестает различать чужеродные и собственные белки. Известно, что абзимы с протеолитической активностью против разных белков обычно специфически гидролизуют только эти белки. В работе показано, что IgG крови ВИЧ-инфицированных больных против гистонов и ОБМ эффективно гидролизуют как гистон H1, так и ОБМ, но не другие контрольные белки. Используя масс-спектрометрию MALDI TOF, найдены сайты расщепления гистона H1 и ОБМ абзимами против этих белков. Сайты гидролиза H1 и ОБМ расположены в разных, но высоко гомологичных сайтах этих белков. Анти-гистон и анти-ОБМ антитела крови ВИЧ-инфицированных больных являются первыми примерами абзимов, обладающих не только кросс-комплексобразованием, но и каталитической перекрестной реактивностью. Согласно литературным данным, в крови больных ВИЧ повышается концентрация гистонов, поэтому существование перекрестной реактивности абзимов против гистонов и ОБМ

© Н. А. Мальцева, И. Ю. Компанец, С. В. Баранова, 2018.

* Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00604; Проектом Базового бюджетного финансирования, выполняемого в рамках Госзадания, по теме № VI.62.1.5 (№ 0309-2016-0003).

представляет большую опасность для человека. Они могут атаковать ОБМ миелиновой оболочки аксонов и играть отрицательную роль в патогенезе заболевания.

Abstract

Autoantibodies with enzymatic activities (abzymes) are distinctive feature of autoimmune and viral diseases. Autoantibodies (Abs) with enzymatic activities (abzymes) are the distinctive feature of autoimmune and some viral diseases. It is known that abzymes with proteolytic activity against different proteins usually specifically hydrolyze only these specific proteins. It was shown that IgGs against histone and MBP effectively hydrolyze both H1 histone and MBP but no other control proteins. Using the MALDI TOF mass spectrometry, the cleavage sites of H1 histone and MBP by abzymes against these proteins are found. The sites of H1 and MBP hydrolysis are located in different clusters of these proteins but they demonstrate high homology of their protein sequences. Anti-histone and anti-MBP abzymes are the first examples of Abs possessing not only with cross-complexing but also with catalytic cross-reactivity, which may be common phenomenon for such abzymes in patients with different autoimmune diseases. The existence of cross-reactivity of abzymes against histones and MBP represent great danger to humans since in contrast to MBP, histones due to cell apoptosis constantly occurs in human blood. They can attack MBP of the myelin sheath of axons and play negative role in the pathogenesis of HIV-infection.

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.

ВИЧ-инфекция, сопровождается иммунным ответом не только на компоненты вирусов и бактерий, но и приводит к специфическому сбою иммунной системы, ведущему к развитию аутоиммунных реакций. Известно, что ВИЧ является не только иммуотропным, но и нейротропным вирусом, патологический процесс при ВИЧ-инфекции затрагивает практически все органы и системы человека, но одним из основных очагов поражения является нервная система, в том числе, и характерное для данной инфекции прямое поражение мозга — подострый энцефалит с участками демиелинизации. Основной белок миелина (ОБМ) играет важную роль в патогенезе рассеянного склероза. В данной работе впервые проанализировали гидролиз ОБМ антителами из сывороток ВИЧ-инфицированных больных. Показано, что способность иммуноглобулинов, гидролизовать основной белок миелина является неотъемлемым свойством антител из крови ВИЧ-инфицированных пациентов.

Гистоны — это белки, которые участвуют в упаковке нитей ДНК в ядре и регуляции ядерных процессов, таких как транскрипция, репликация и репарация. Низкая концентрация гистонов ведет к повреждению ДНК, а в большом количестве гистоны токсичны для клетки. Показано, что 100 % IgG из крови ВИЧ-инфицированных пациентов эффективно расщепляют от одного до пяти человеческих гистонов. Таким образом, абзимы против гистонов могут играть важную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции и, вероятно, в развитии различных аутоиммунных заболеваний.

Известно, что абзимы с протеолитической активностью против разных белков обычно специфически гидролизуют только эти белки. Используя, последовательную хроматографию гомогенных IgG на колонках с иммобилизованными гистонами, а затем хроматографии фракции, не содержащей антител, обладающих сродством к гистонам (элюируемому при нанесении) на ОБМ-сефарозе, получены антитела против ОБМ. Показано, что IgG против гистонов и ОБМ эффективно гидролизуют как гистон H1, так и ОБМ, но не другие контрольные белки. Используя масс-спектрометрию MALDI, найдены сайты расщепления H1-гистона и ОБМ абзимами против этих белков. Интересно, что гидролиз ОБМ анти-ОБМ антителами происходит в четырех кластерах, расположенных на четырех известных антигенных детерминантах ОБМ. Анти-гистон абзимы гидролизуют ОБМ только в одном кластере. Этот кластер частично перекрывается с одним из четырех сайтов гидролиза ОБМ. Анти-гистон-антитела гидролизуют H1 в одном кластере белка, а анти-ОБМ IgG расщепляют этот гистон в двух кластерах. Сайты гидролиза H1 и ОБМ расположены в разных кластерах этих белков, но они демонстрируют высокую гомологию этих белковых последовательностей.

До сих пор в литературе не было данных о кросс-гидролизе белков антителами против разных белков. Абзимы, анти-гистон и анти-ОБМ, являются первыми примерами иммуноглобулинов, обладающих не только кросс-комплексообразованием, но и каталитической перекрестной реактивностью, что может быть обычным явлением для таких абзимов у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями.

Существование ферментативной перекрестной реактивности абзимов против различных белков и особенно гистонов и ОБМ представляет большую опасность для человека. Это связано с тем, что апоптоз клеток происходит постоянно даже у здоровых людей, что приводит к появлению гистонов и их различных комплексов в крови. В случае каталитической перекрестной реактивности получение абзимов против гистонов может привести к атаке миелиновой оболочки аксонов и гидролизу ОБМ. Таким образом, гидролиз ОБМ как анти-ОБМ, так и анти-гистон-антителами может играть отрицательную роль в патогенезе ВИЧ-инфекции.

**ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК
ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 (TDP1)
И ЕГО ПРИРОДНОГО МУТАНТА SCAN1 КАК ПРОТОТИПЫ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ***

TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1 (TDP1) A
ND ITS NATURAL MUTANT SCAN1 INHIBITORS
AS PROTOTYPES OF DRUGS

Е. М. Мамонтова^{1,2}, К. С. Ковалева^{2,3}, А. Л. Захаренко¹, О. И. Яровая³,
Й. Рейниссон⁴, О. Д. Захарова¹, Е. С. Ильина¹, О. И. Лаврик^{1,2}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Институт органической химии СО РАН*

⁴ *Школа химических наук, университет Окленда, Новая Зеландия*

E. Mamontova^{1,2}, K. Kovaleva^{2,3}, A. Zakharenko¹, O. Yarovaya³, J. Reynisson⁴,
O. Zakharova¹, E. Ilina¹, O. Lavrik^{1,2}

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

² *Novosibirsk State University, Russia;*

³ *Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia;*

⁴ *School of Chemical Sciences, University of Auckland, New Zealand*

E-mail: evgeniya.mm.94@gmail.com

Аннотация

Был проведен скрининг 37 соединений — производных кумарина, β-карболина и дегидроабетиламина в качестве ингибиторов фермента тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1) и его мутантной формы SCAN1. Tdp1 является важной мишенью для противораковой терапии, SCAN1 связан с одноименным нейродегенеративным заболеванием (спинocerebellарная атакия с аксональной нейропатией), и также рассматривается как мишень для лечения этого заболевания. Наиболее активные соединения имели значения IC₅₀ в диапазоне 0,1–1 мкМ (в отношении Tdp1). Впер-

© Е. М. Мамонтова, К. С. Ковалева, А. Л. Захаренко, О. И. Яровая, Й. Рейниссон, О. Д. Захарова, Е. С. Ильина, О. И. Лаврик, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ 17-04-01071, 18-33-00297.

вые были обнаружены ингибиторы SCAN1 (IC_{50} ~3.5–10 мкМ для наиболее активных ингибиторов). Соединения показали низкую цитотоксичность на клеточных линиях A-549, MCF-7, T98G и WI-38. Некоторые соединения усиливают цитотоксичность топотекана на линиях A-549 и T98G.

Abstract

In the present study we performed screening of 37 compounds — derivatives of coumarin, β -carboline and dehydroabietylamine as inhibitors of tyrosyl-DNA-phosphodiesterase 1 (Tdp1) and its mutant SCAN1. Tdp1 is important target for anticancer therapy. SCAN1 is associated with the neurodegenerative disease of the same name (spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy) and is also considered as a target for the treatment of this disease. The most active compounds have IC_{50} value of 0.1–1 мкМ against Tdp1. Also the inhibitors of SCAN1 were found (IC_{50} ~3.5–10 мкМ for the most active compounds). The compounds showed low cytotoxicity against human tumor A-549, MCF-7, T98G cell lines and non-tumor WI-38 cell line and the ability to increase the topotecan cytotoxicity on A-549 and T98G lines.

The development of inhibitors of DNA repair enzymes is a promising approach in medicinal chemistry. The design of drugs based on inhibition of DNA repair pathways can provide new specific and less toxic treatments for oncological, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) is a promising target for cancer and neurodegenerative therapy.

Tdp1 plays a key role in the removal of damage caused by topoisomerase 1 inhibitors such as camptotecin and its derivatives topotecan and irinotecan [1]. Last two compounds are the antitumor drugs widely used in clinical practice [2]. It makes this enzyme a promising target to enhance anticancer treatment in conjunction with DNA damaging therapies. The hypothesis that Tdp1 is responsible for drug resistance of some cancers is supported by a number of studies. Tdp1^{-/-} mice and cell lines with SCAN1 mutation, that reduces in vitro catalytic activity compared to the wild type enzyme, are hypersensitive to camptotecin [3]. Otherwise, cell lines with enforced expression of Tdp1 showed fewer DNA damage caused by camptothecin [4]. The use of Tdp1 inhibitors together with Top1 inhibitors would prevent the path of repair and lead to the sensitization of cancer cells to chemotherapy.

Natural mutant of Tdp1 (SCAN1) with the replacement of His493 in the active center of the enzyme to Arg493 is associated with severe neurodegenerative disease SCAN1 (spinocerebellar ataxia syndrome with axonal neuropathy) [5]. SCAN1 phenotype does not appear until the second decade of life and is not associated with an increased risk of cancer or immunodeficiency states. Probably, the pathology is caused by the accumulation of the SCAN1-DNA covalent

cleavage complexes formed during the reaction [6]. Therefore, the suppression of SCAN1 activity can improve the quality of life of SCAN1 patients and prevent the progression of the disease.

The compounds tested are the derivatives of natural biologically active compounds: coumarins, β -carbolines and dehydroabietylaminines. As a test system to determine the inhibitory properties of compounds, fluorescent biosensor was used. Biosensor is a DNA oligonucleotide with fluorophore FAM at the 5'-end of DNA and fluorescence quencher BHQ1 at the 3'-end [7]. During the reaction, the enzyme removes the quencher from the 3' end of the DNA, resulting in an increase of the fluorescence. The signal is detected in real time and IC_{50} value (inhibitor concentration at which the enzyme activity is reduced by half) is calculated. In the present work 37 compounds were studied. 13 inhibitors of SCAN1 were found and their IC_{50} values were calculated. Among the 37 compounds studied, 30 Tdp1 inhibitors were detected. Effective inhibitors of Tdp1 with an IC_{50} value of 0.1–1 μ M were found.

Using these compounds together with anti-cancer drugs such as topotecan, we expect to receive sensitization of the tumor to their effect, which in turn can give: 1) reduction of side effects from anticancer drugs by reducing the dose of the drug and 2) increasing the effectiveness of therapy. Therefore, these compounds should have low own cytotoxicity, but enhance the cytotoxicity of anticancer drugs. To determine the cytotoxicity, a standard MTT test was used. All the compounds demonstrated low cytotoxicity against A-549, WI-38, T98G and MCF-7 cell lines (for most compounds >100 μ M), Fig. 1. Moreover, some compounds enhanced the cytotoxicity of topotecan in A-549 (Fig. 2) and T98G cell lines (not shown).

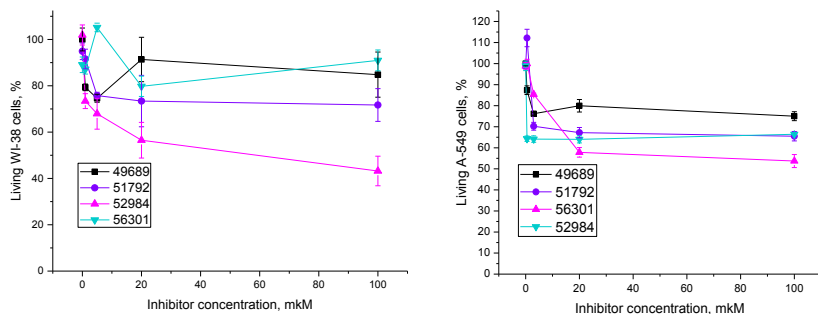


Fig. 1. Dependence of the number of living cells A-549 (left) and WI-38 (right) on inhibitor concentration (49689, 51792, 56301, 52984 — coumarine derivatives)

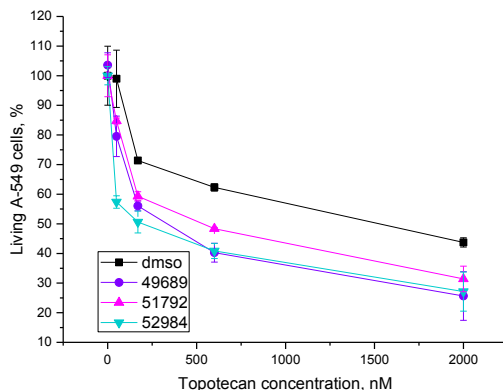


Fig. 2. Enhancement of cytotoxicity of topotecan for A-549 cell line. The boxes indicate the compounds used in combination with topotecan. DMSO was used in the control experiments (vehicle for compounds)

To sum up, we performed the screening of biologically active compounds as inhibitors of Tdp1 and SCAN1 and calculated their IC_{50} values. We also determined cytotoxicity of compounds against the number of cell lines, including their self-cytotoxicity and their ability to enhance topotecan cytotoxicity. Thus, we found the compounds promising for the further development of both anticancer drugs and drugs for the treatment of the neurodegenerative disease SCAN1.

Литература

1. F. Cortes Ledesma [et al.]. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage// *Nature*. — 2009. — Vol. 461. — № 7264. — P. 674–678.
2. Y. Pommier. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond// *Nature Reviews. Cancer*. — 2006. — Vol. 6. — Topoisomerase I inhibitors. — № 10. — P. 789–802
3. S. F. El-Khamisy [et al.]. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin // *DNA repair*. — 2009. — Vol. 8. — № 6. — P. 760–766.
4. Meisenberg [et al.]. Clinical and cellular roles for TDP1 and TOP1 in modulating colorectal cancer response to irinotecan // *Mol Cancer Ther*. — 2015. — Vol. 14. — P. 575–585.
5. H. Takashima [et al.]. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy // *Nature Genetics*. — 2002. — Vol. 32. — № 2. — P. 267–272.

6. H. Interthal [et al.]. SCAN1 mutant Tdp1 accumulates the enzyme--DNA intermediate and causes camptothecin hypersensitivity // The EMBO journal. — 2005. — Vol. 24. — № 12. — P. 2224–2233.

7. A. Zakharenko [et al.]. Synthesis and biological evaluation of novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors with a benzopentathiepine moiety // Bioorganic & Medicinal Chemistry. — 2015. — Vol. 23. — № 9. — P. 2044–2052.

ЗАПОЛНЕНИЕ ПРОБЕЛОВ ПРОЕКТНОГО ГЕНОМА S. PASTORIANUS С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ILLUMINA

FILLING GAPS OF S. PASTORIANUS DRAFT GENOME USING ILLUMINA SEQUENCING DATA

А. Медина², А. Овалле³, Э. Лопез¹, Дж. Розалес⁵, И. Сонец⁴

¹ TUHH (Technische Universität Hamburg), Germany

² Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Mexico

³ Universiad Autonoma de Nuevo Leon, Mexico

⁴ Центральная научно-исследовательская лаборатория СибГМУ, РФ

⁵ Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural,
Pesca y Alimentación, Mexico

A. Medina², A. Ovalle³, E. Lopez¹, J. Rosales⁵, I. Sonets⁴

Аннотация

Технологии секвенирования нового поколения позволили получить геном многих новых штаммов дрожжей, основного микроорганизма, используемого в ферментации пива. В процессе изучения мы можем найти некоторые гибридные дрожжи, такие как *S. pastorianus*, гибрид между *S. cerevisiae* и *S. eubayanus*. Недавно был создан проект гибридной последовательности генома; однако количество пробелов является значительным, поэтому задача заключается в улучшении качества за счет закрытия пробелов с использованием искусственных бактериальных хромосом (BACs), секвенированных с помощью технологии Illumina, для определения порядка скэффолдов и для выявления возможных перекрытий между ними.

Abstract

Next-generation sequencing technologies have allowed genome acquisition of many new strains of yeast, the main microorganism used in the beer fermentation. In this processes we can found some hybrid yeasts like *S. pastorianus*, a hybrid between *S. cerevisiae* and *S. eubayanus*. Recently a draft hybrid genome sequence was generated; however, the numbers of gaps are considerable, therefore the challenge is the improvement of the quality through closing the gaps using BACs sequencing by Illumina, to determine the order of the remaining scaffolds and to identify potential sequences overlaps between them.

Introduction

The *Saccharomyces sensu stricto* complex includes some parented species: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus*, etc. However, it has been

observed that lager-brewing yeast is a hybrid species of two combined genomes of *S. eubayanus* and *S. cerevisiae*. This provides an important source of chromosomal rearrangements, leading to the gene number and the size of the complete genome. With the use of next generation sequencing (NGS) technologies, such as the Illumina Platform, many eukaryotes genomes have been reported, including different strains of the *Saccharomyces* complex (Krogerus, 2017; Medina, 2016).

Recently the assembly of a new hybrid genome was made in a previous study by Cintia Muñoz (Dataset 1, DS1) using 454 and Illumina next generation sequencing platforms. However, the number of gaps are considerable, for that reason, the implementation of a new strategy using next generation sequencing with bacterial artificial chromosome (BACs) is a viable option for closing that gaps and improve the equality of the sequence.

Here, we report a new draft sequence of the hybrid genome of the lager brewing yeast strain (Dataset 2, DS2). We perform 2 strategies: first, generate an assembly with Illumina BACs sequences and aligned the new scaffolds with DS1 trying to close the gaps; second, generated *de novo* yeast genome assembly from 454 and Illumina platforms.

The DS1 assembly was obtained from a previous study by Cintia Muñoz. For the present study, BACs sequencing by Illumina were used (DS2). The sequencing quality data were analyzed with *FastQC* tool. The raw paired BAC sequences were filtered with *bowtie2* tool, removing the vector sequence attached to the BAC sequence, losing the 48 percent of the reads. For *de novo* assembly we used 3 another datasets (DS3, DS4, DS5). We obtained these data sets using 454 and Illumina sequencing platforms.

Genome assembly

We used *segemehl* tool (a software to map short sequencer reads to reference genomes, capable to detect mismatches and indels) to validate the quality of the assembly DS1 aligning the reads of DS2 (without contamination).

The set sequence DS2 was assembled with *SPAdes* tool obtaining the necessary scaffolds to perform an alignment with the DS1 assembly using *BLAT* tool and fill the gaps.

One *de novo* genome assembly was made using 454 and Illumina (Mate pair and Illumina Pair end platforms), using *SPAdes* tool.

Results and discussion

A preliminary genome assembly in form of a scaffold was mapped with paired reads from sequences of a hybrid *Saccharomyces* previously contained in BACs. The main objective of this mapping was the assessment of the quality of the preliminary assembly detecting gaps/splits using *segemehl* tool. We obtained as an

output a list of coordinates to compare with the DS1 assembly; however, we cannot graph the expected values and visualize the results.

In the first strategy, we were able to visualize with IGB the results. DS4 assembly was loaded as the reference genome and the .bam file was loaded to visualize the mapping of clean DS5 reads against the assembly. As expected, clusters of reads aligned to the ends of some scaffolds, suggesting that the assembled sequence will be able to extend it. See Fig. 1.

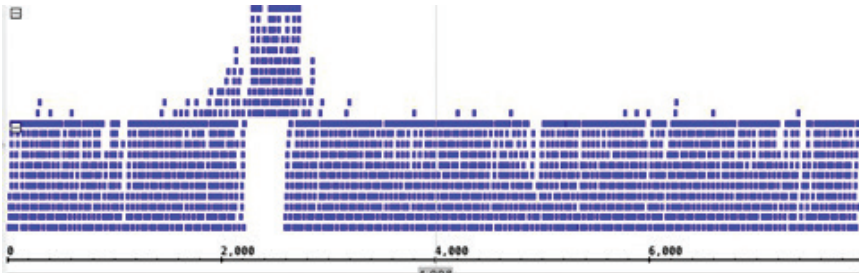


Fig. 1. Clusters of read in one scaffold

DS5 assembly was loaded as a reference genome. The .bam files of the alignments against the DS5 assembly of both the reads that mapped and those that didn't map to DS4 assembly were loaded for visualization. In certain regions, the DS4-unmapped reads cover holes left by the DS4-mapped reads, thus suggesting that the corresponding scaffold of the DS5 assembly fills up a gap in the DS4 assembly.

SPAdes uses Bruijn graph like *Velvet* tool, but it generates the node sequences differently. They include the entirety of the first k-mer in each node. With *Bandage* we can visualize the nodes and the edges of our *de novo* genome assembly. See Fig. 2.

Conclusion

Starting from a preliminary task in which empty fragments were located on the chromosomal sequence of the yeast, the hypothesis of being able to fill said gaps

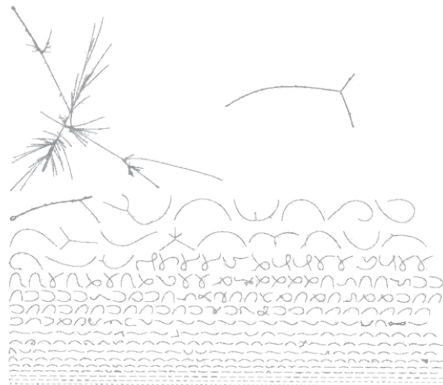


Fig. 2. Graph of de novo assembly

with additional data set coming from a BAC sequencing test was established. There were also several sets of new data, with these a new assembly was made to have a new reference to which the data of the BACs would be mapped. In our first strategy, it was possible to visualize some reads that could fill some gaps of the original assembly; however, it is necessary to validate these results.

In the second strategy, the de novo assembly obtained did not have the expected quality. Additional attempts of de novo assembling should be performed, changing the parameters, testing different assemblers and rectifying the trimming of the raw data.

References

[Kristoffer Krogerus, 2017] Kristoffer Krogerus, Frederico Magalhães, V. V. B. G. (2017). Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1(101):65–78. Published online.

[Patricia Marcela De Le'on-Medina, 2016] Patricia Marcela De Le'on-Medina, Ramiro Elizondo, L. C. D. J. M. M. V. d. B. L. G. B. P. (2016). Genome annotation of a *saccharomyces* sp. lager brewer's yeast. *Genomics Data*.

ОБНАРУЖЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ЯЗВЫ МЕТОДАМИ МЕТАБОЛОМИКИ*

BIOMARKERS DISCOVERY OF DIABETIC ULCER BY METHABOLOMICS METHODS

А. Д. Мельников, В. В. Яньшолё

*Международный томографический центр СО РАН
Новосибирский государственный университет*

A. D. Melnikov, V. V. Yanshole

*International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk, Russia
Novosibirsk State University*

E-mail: melnikov.arsenty@gmail.com

Аннотация

Анализ метаболомных данных является довольно затруднительной задачей, для решения которой необходимо использовать специальные методы первичной обработки, а также статистические методы анализа данных. Корректная обработка данных позволяет изучать патогенез болезней и обнаруживать возможные биомаркеры. Данная работа позволила определить возможные биомаркеры развития язв у больных сахарным диабетом. Диабетическая язва является одним из самым распространенных осложнений диабета и очень часто приводит к ампутации конечностей.

Abstract

Analysis of metabolic data is a rather difficult task, for the solution of which it is necessary to use special preprocessing methods as well as statistical methods of data analysis. A proper data processing allows to study the pathogenesis of diseases and to discover possible biomarkers. This study determined possible biomarkers for the development of ulcers in patients with diabetes mellitus. Diabetic ulcer is one of the most common complications of diabetes, which very often leads to an amputation.

Введение

Метаболомика является экспериментальной областью для изучения патогенеза различных болезней и поиска возможных биомаркеров, основанная на анализе низкомолекулярных соединений — метаболитов. Одной из

© А. Д. Мельников, В. В. Яньшолё, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке российского фонда фундаментальных исследований (гранты №17-03-00656, №18-415-543006).

самых распространенных платформ для метаболомного анализа является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС). ВЭЖХ-МС является высокочувствительным методом, что позволяет детектировать большое число метаболитов, однако это приводит к трудностям, связанным с корректной обработкой больших объемов данных и правильным выявлением зависимостей между образцами. Основной целью метаболомного анализа является поиск метаболитов, чьи концентрации изменяются при развитии заболевания. Так в данной работе изучались изменения, вызванные развитием диабетических язв.

Диабетическая язва является одним из самых распространенных осложнений диабета. Существует два типа сахарного диабета. Первый тип является результатом нарушения работы поджелудочной железы, которая перестает производить достаточное количество инсулина. Второй тип характеризуется нарушенным взаимодействием инсулина с клетками. В результате заболевания нарушаются энергетические процессы в клетке, увеличивается катаболизм липидов и белков. Это очень часто приводит к развитию различных осложнений. В настоящее время проведено большое число метаболомных работ, посвященных сахарному диабету, однако лишь совсем малая их часть посвящена осложнениям сахарного диабета, в том числе и диабетической язве.

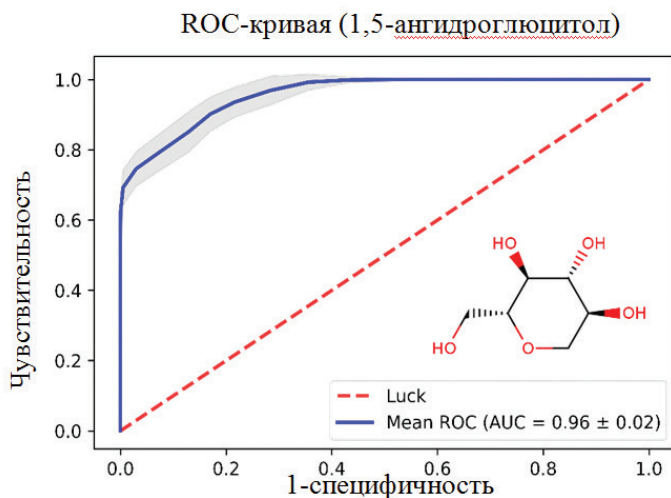
Методы

Для метаболомного профилирования использовались два вида высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, гидрофильная (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) и обращено-фазовая (ОФЖХ). HILIC хорошо удерживает полярные соединения, в то время как ОФЖХ более эффективна для неполярных соединений. Таким образом, использование двух видов хроматографии заметно повышает охват регистрируемых соединений, что позволяет получать более полную информацию о метаболомном составе образцов. Для обработки данных использовались как готовые библиотеки для языков R и Python, так и подходы, разработанные в ходе данной работы.

Результаты

Был проведен метаболомный анализ образцов сыворотки крови пациентов больных сахарным диабетом 2 типа без осложнений и пациентов больных сахарным диабетом 2 типа с диабетическими язвами. Для обработки и анализа данных был разработан специальный подход, который позволил заметно упростить получение биологически значимых результатов.

Концентрации большинства метаболитов существенно не изменяются с развитием диабетической язвы. Обнаружен ряд метаболитов, уровни которых достоверно отличаются: 1,5-ангидроглюцитол (повышается в 3 раза), билирубин (уменьшается в 3 раза), и группы фосфолипидов, концентрация которых в среднем падает в 1,5 раза (значения p -value для всех соединений не превышают 0,05). Для оценки эффективности использования данных соединений в качестве биомаркеров были построены ROC-кривые и посчитаны площади под кривыми, метрика AUC. Данный подход является стандартным при поиске биомаркеров. Наибольшее значение AUC было получено для 1,5-ангидроглюцитол (см. рисунок).



ROC-кривая, построенная для 1,5-ангидроглюцитол,
со значением AUC = 0,96±0.02

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С *BACILLUS THURINGIENSIS*

THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PHOSPHOLIPASE C FROM *BACILLUS THURINGIENSIS*

Ю. А. Меркульева¹, А. А. Бондарь², Д. Н. Щербаков^{1,3}

¹ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

² Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

³ Алтайский государственный университет

Yu.A. Merkulyeva¹, A.A. Bondar², D.N. Shcherbakov^{1,3}

¹ FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

² ICBFM SB RAS, Novosibirsk, Russia

³ Altai State University, Barnaul, Russia

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

Аннотация

В работе выполнен поиск вариантов гена *plc*, кодирующего фосфолипазу C, у бактерий *Bacillus thuringiensis* из коллекции штаммов ГНЦ ВБ «Вектор» и получены продуценты термостабильных рекомбинантных вариантов фермента.

Abstract

In this work the search for *plc* gene encoding a phospholipase C from *Bacillus thuringiensis* from the collection of strains of the SRC VB “Vector” has been done. And the producers of thermostable recombinant variants of the enzyme were obtained.

Ферменты микробного происхождения занимают лидирующие позиции среди промышленных ферментов, благодаря их огромному разнообразию, доступности и ценным технологическим свойствам.

Среди липолитических ферментов широкое применение получили фосфолипазы — ферменты класса гидролаз, катализирующие расщепление фосфолипидов.

Фосфолипаза C (PLC, EC 3.1.4.3) — катализирует гидролиз фосфолипидов с образованием 1,2-диацилглицерола и фосфорного эфира соответствующего амина. Фосфолипазы используют в фундаментальных исследованиях

и медицине, однако, наиболее перспективным является их применение в процессе рафинирования растительных масел, а так же на аналогичной стадии в процессе предварительной обработки масла при производстве биодизеля.

Неочищенное растительное масло может содержать до 3 % фосфолипидов, которые снижают качество масла при хранении и выход продукта при рафинировании. Использование PLC позволяет повысить эффективность очистки масла и сократить потери сырья. Оптимальным ферментом для использования в промышленном рафинировании растительных масел является фосфолипаза С из бактерий рода *Bacillus*, поскольку фермент обладает наиболее подходящим спектром субстратной специфичности, высокой термостабильностью и удельной активностью.

Ферментные препараты PLC *B. cereus* и *B. anthracis* уже успешно применяются в промышленности. *B. thuringiensis* так же входит в таксономическую группу *Bacillus cereus sensu lato*, что является предпосылкой для поиска новых вариантов фермента с высоким технологическим потенциалом.

Целью данной работы являлась разработка продуцента термостабильной фосфолипазы С *B. thuringiensis*.

Для исследования были взяты штаммы *B. thuringiensis* из коллекции ГНЦ ВБ «Вектор». С помощью сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК проводили филогенетический анализ исследуемых штаммов. Так же был проведен молекулярно-генетический анализ гена *plc*, кодирующего фосфолипазу С *B. thuringiensis*.

На основе разнообразия транскрибуемых аминокислотных последовательностей были отобраны и клонированы 12 вариантов гена фосфолипазы С.

Для получения рекомбинантного белка на основе вектора рНТ255 были сконструированы рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие продукцию PLC в бактериальной системе *Bacillus subtilis*.

Скрининг активности полученных вариантов PLC проводили методом спектрофотометрии с использованием субстрата п-нитрофенилфосфорилхолина (рNPPC). Было показано, что все полученные варианты фермента обладают фосфолипазной активностью и выдерживают температурную обработку при 80 °С в течение 1,5 часов.

Разработанные в настоящей работе продуценты рекомбинантных вариантов фосфолипазы С ориентированы на производство ферментов, используемых в промышленности, кроме того, полученные рекомбинантные PLC будут использованы для исследования влияния выявленных аминокислотных замен на свойства фермента.

**ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СКОРОСТЬ
ДОСТИЖЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО ВОЗРАСТА НЕПАРНЫМ
ШЕЛКОПРЯДОМ (*LYMANTRIA DISPAR* L)**

INFLUENCE OF VARIOUS NUTRITION AND PHYSICAL FACTORS
ON THE SPEED OF ACHIEVING THE TARGET AGE
OF GIPSY MOTH (*LYMANTRIA DISPAR* L)

О. В. Охлопкова, А. А. Томилов, А. В. Дручинина, А. В. Колосов

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

O. V. Okhlopova, A. A. Tomilov, A. V. Druchinina, A. V. Kolosov

FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор, Russia

E-mail: ohlopkova_ov@vector.nsc.ru

Аннотация

В процессе исследования проводилось изучение влияния различных рационов (искусственных и естественных) и физических факторов (влажность, температура) на скорость достижения целевых возрастов непарным шелкопрядом в лабораторных условиях, а также определение чувствительности насекомых к вирусу ядерного полиедроза.

Abstract

During the research, the influence of various rations (artificial and natural) and physical factors (humidity, temperature) on the rate of achievement of target ages of gipsy moth in laboratory conditions was studied, as well as the sensitivity of insects to the nuclear polyhedrosis virus.

Предотвращение загрязнения окружающей среды становится одной из наиболее актуальных проблем современности. В результате хозяйственной деятельности человека в окружающую среду поступает огромное количество вредных соединений, которое представляет опасность как для природы в целом, так и для самого человека в частности. Одним из видов такого рода хозяйственной деятельности человека является защита леса от вредителей в лесном хозяйстве. Основная нагрузка на биосферу в рамках данного вида хозяйственной деятельности идет от применения химических пестицидов

в борьбе с насекомыми-вредителями. 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 щадящей защиты растений. В частности широко используются энтомопатогенные препараты на основе семейства *Baculoviridae*, семейства вирусов, которые в природе поражают фитофагов из отряда *Lepidoptera*, одним из представителей которого является непарный шелкопряд.

Вирус ядерного полиэдроза (ВЯП) является наиболее патогенным в семействе вирусов *Baculoviridae*. ВЯП обладает высокой селективностью по отношению к насекомым, что позволяет ему поражать только целевых насекомых и не оказывать влияния на остальные виды животных и растений. Это делает препараты на основе вируса ядерного полиэдроза перспективным энтомопатогенным средством.

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, также в исследовательской работе была затронута тема оптимизации физических факторов при культивировании насекомых.

Объектами исследования были непарный шелкопряд (НШ) и вирус ядерного полиэдроза непарного шелкопряда, как наиболее актуальные для Сибирского федерального округа, который традиционно считается одним из основных лесозаготовительных регионов страны.

Цель данной работы: установление скорости достижения целевого возраста непарным шелкопрядом при культивировании на естественных и искусственных питательных средах, изучение влияния физических факторов при культивировании насекомых.

В эксперименте по изучению влияния естественных питательных сред отродившихся гусениц рассаживали группами в банки объемом 500 мл, в банки помещали листья: березы повислой, рябины сибирской, липы сердцевидной, яблони сибирской, лиственницы сибирской и вяза обыкновенного и, далее таким образом насекомые культивировались до достижения целевого возраста. Данные породы деревьев были выбраны как наиболее характерные для Сибирского федерального округа. При культивировании НШ фиксировались личиночные стадии. Эксперимент показал, что культи-

вирование с использованием лиственницы сибирской в качестве естественной питательной среды позволяет получать насекомых целевого возраста в среднем за 20 дней от момента активации яиц, в то время как остальные породы дают отрицательный результат.

В ряде случаев, в частности в лабораторных экспериментах, естественная питательная среда может быть заменена на искусственную, при условии, что в ней будет оптимальное для объекта исследования соотношение всех необходимых нутриентов. В рамках данного исследования было предложено два состава искусственных питательных сред (ИПС) с ведущим компонентом «Кукуруза» и ведущим компонентом «Чечевица» (см. таблицу).

Качественные составы ИПС

Кукурузная ИПС	Чечевичная ИПС
Мука кукурузная	Чечевица
Мука соевая	Мука ржаная
Аскорбиновая кислота	Мука гречневая
	Комплекс витаминов и минералов
Дрожжи кормовые	
10%-й спиртовой раствор бензойной кислоты	
Агар-агар	
Вода дистиллированная	

В данном эксперименте по изучению влияния искусственных питательных сред отродившихся гусениц рассаживали группами в чашки Петри с ИПС, которые различались по ключевым компонентам: 1) кукурузная мука, 2) чечевица. При культивировании ИПС фиксировались личиночные стадии. В результате исследования было установлено, что скорость достижения III возраста у гусениц, культивируемых на ИПС с кукурузной мукой, составила 20 ± 1 суток. Для насекомых, культивируемых на ИПС с чечевицей, данный показатель составил 16 ± 1 суток.

Важным моментом при выращивании насекомых в лабораторных условиях является создание так называемого экологического оптимума (определенное сочетание факторов, которое характерно для каждой конкретной популяции) экологически пессимальных и экологически оптимальных факторов. Температура тела насекомого имеет прямую зависимость от температуры окружающей среды, которая определяет поведенческие реакции, размеры тела, плодовитость, продолжительность жизни, темпы онтогенеза и интенсивность обмена веществ. Действие температуры также неотделимо

от влажности воздуха. Вместе они оказывают прямое (гибель организма при отклонении от оптимума) и косвенное (через корм) влияние на популяцию.

Подбор наиболее благоприятных физических условий для культивирования непарного шелкопряда. Подготовка эксперимента: эксперимент проводился в двух термостатах с различной температурой и влажностью. В первом термостате температура 24 °С и повышенная влажность (~70 %). Во втором термостате температура 26 °С, влажность низкая.

Для эксперимента подготовили яйца непарного шелкопряда, очистив их от грены. После яйца разделили на шесть равных частей и поместили в шесть пронумерованных чашек Петри с искусственной питательной средой. Первые три чашки поместили в первый термостат, чашки с номерами 4, 5, 6 во второй термостат. Каждый день в период проведения эксперимента поддерживалась определенная температура и влажность в каждом термостате вне зависимости от учета показателей в этот день, в среднем экспозиция по продолжительности составляла 5–7 часов непрерывной работы увлажнителя, температура оставалась всегда постоянной в термостатах.

Таким образом, количество суток необходимое для достижения целевых возрастов для насекомых, которых культивировали при температуре 24 °С и повышенной влажности (~70 %) в термостате 1, составило примерно 14 дней. Для насекомых, которых культивировали при температуре 26 °С и пониженной влажности (~40 %) в термостате 2, данный показатель превысил 2 недели.

Для того чтобы оценить не изменилась ли чувствительность насекомых к вирусу ядерного полиэдроза непарного шелкопряда насекомые инфицировались ВЯП НШ-10-07. На искусственную питательную среду наносили вирусную суспензию и культивировали на ней насекомых. Причину гибели гусениц устанавливали микроскопическим методом. В среднем время гибели насекомых составило 13–15 суток, что говорит о том, что смена питания при культивировании не сказывается на чувствительности насекомых к вирусу.

В результате проведенного исследования были выявлены определенные тенденции при культивировании непарного шелкопряда. Наиболее благоприятной оказались такие физические условия, как повышенная влажность и температура около 24 °С. Искусственная питательная среда на основе чечевицы оказалась эффективнее, чем среда с ведущим компонентом кукурузной муки и естественные питательные среды. Данные вариации в культивировании не сказались отрицательно на чувствительности насекомых к вирусу.

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ И КРАХМАЛА
ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД
И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ ***

**STUDY OF PROPERTIES OF MICROALGAE STRAINS
WITH HIGH CONTENT OF LIPIDS AND STARCH FOR APPLICATION
IN WASTEWATER TREATMENT AND USE IN BIOENERGY**

А. В. Пилигаев¹, К. Н. Сорокина^{1,2},
Ю. В. Самойлова¹, В. Н. Пармон^{1,2}

¹ *ФГБУН Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН*

² *Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

A. V. Piligaev¹, K. N. Sorokina^{1,2}, Y. V. Samoylova¹, V. N. Parmon^{1,2}

¹ *Boraskov Institute of Catalysis, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

E-mail: sorokina@catalysis.ru

Аннотация

Липиды и крахмал являются конечной формой запасаания энергии в микроводорослях в стрессовых условиях, а их метаболизм тесно связан между собой. Выявление перспективных штаммов-продуцентов этих веществ является одним из важных направлений исследований в биотехнологии микроводорослей. В данном исследовании проведен скрининг свойств новых штаммов микроводорослей по продукции липидов и крахмала и изучены их метаболические особенности в процессе накопления липидов.

Abstract

Lipids and starch are the major form of energy storage in microalgae under stressful conditions and their metabolism is closely related. Isolation of promising microalgal strains producing these substances is one of the important areas of research in microalgal biotechnology. In this study, the properties of new microalgal strains were screened for the production of lipids and starch and their metabolic characteristics were studied.

© А. В. Пилигаев, К. Н. Сорокина, Ю. В. Самойлова, В. Н. Пармон, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-73-30032).

Получение энергии из возобновляемых источников сырья в последнее время является общемировым трендом. Микроводоросли являются перспективным возобновляемым сырьём, в том числе для производства биотоплива третьего поколения. Однако высокая стоимость используемых технологий сдерживает их широкое использование в промышленности для получения моторных топлив. Выбор подходящего штамма-продуцента для получения целевых продуктов, а также снижение затрат при культивировании играют решающее значение для разработки более эффективных технологий получения возобновляемого сырья.

Целью данной работы являлся поиск штаммов микроводорослей с высоким содержанием липидов и крахмала, пригодных для использования в водоочистке и получения продуктов с высокой добавленной стоимостью.

Материалы и методы

Чистые культуры микроводорослей выделяли из образцов почв и воды, отобранных в Западной Сибири, Северном Казахстане и на северо-восточном побережье Черного моря. Таксономическую идентификацию проводили по последовательности гена 18S рРНК (для отдельных штаммов дополнительно использовали участки ITS1, 5,8S рРНК и ITS2). Скрининг по способности накопления липидов и крахмала в малых объемах проводили в стерилизованных сточных водах с очистных сооружений г. Новосибирска (среда MWW), а также на синтетических средах OECD [1] и BBM [2]. Исследование влияния стрессовых условий (в том числе концентрации азота, фосфора в среде и общей солености) на продуктивность по крахмалу проводили на синтетической среде BBM. Накопление нейтральных липидов в клетках оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции после окрашивания красителем Nile Red. Анализ содержания крахмала проводили антроновым методом, как описано в [3]. Анализ состава жирных кислот и состава метаболитов микроводорослей проводили методом ГХ/МС на приборе Agilent 7000B.

Результаты

В работе проведено исследование свойств 15 штаммов микроводорослей, из которых 8 штаммов выделены в ходе работы из природных источников, 7 штаммов получены из коллекций микроводорослей и были использованы для сопоставления их свойств со свойствами штаммов, выделенными в ходе работы. Филогенетический анализ на основе гена 18S рРНК выявил принадлежность выделенных штаммов к родам *Chlorella*, *Micractinium*, *Parachlorella*, *Desmodesmus* и *Scenedesmus*.

Содержание крахмала в стационарной фазе роста при скрининге на используемых средах варьировалось от 2,1 до 28,6 % по сухому весу в зави-

симости от штамма. Штаммы рода *Scenedesmus* и *Desmodesmus* обладали наименьшим содержанием крахмала, в то время как штаммы, идентифицированные как *Parachlorella kessleri*, обладали при скрининге самым высоким содержанием крахмала от 20,2 до 28,6 % от веса сухой биомассы. Из них штамм *Parachlorella kessleri* IC-11 был выделен в ходе работы и обладал при культивировании в сточной воде в стационарной фазе роста содержанием крахмала $28,6 \pm 0,9$ % от веса сухой биомассы. При исследовании влияния стрессовых факторов на среде BBM на уровень накопления крахмала выявлено, что снижение содержание азота и фосфора на 50 % в исходной среде, а также увеличение общей солености до 2 % приводило в среднем к полуторократному кратному увеличению содержания крахмала в стационарной фазе роста, и было максимальным для штамма *Parachlorella kessleri* IC-11 (с $19,3 \pm 1,5$ % до $28,7 \pm 1,2$ %).

Флуоресцентный анализ с использованием красителя Nile Red показал, что при культивировании на используемых средах высоким содержанием нейтральных липидов обладали штаммы *C. sorokiniana* IC-62, *C. sorokiniana* IPPAS C-1, *Micractinium* sp. IC-44 и *Micractinium* sp. IC-76, из них максимальная продуктивность по липидам отмечена для штамма *Micractinium* sp. IC-76 и составила $13,5 \pm 1,5$ мг л⁻¹ сут⁻¹, при общем содержании липидов $36,3 \pm 0,11$ % от веса сухой биомассы, при этом общее содержание насыщенных и моновенасыщенных жирных кислот составило 71,9 % от суммы всех жирных кислот. Также показано, что штамм *Micractinium* sp. IC-76 эффективно удалял соединения азота и фосфора из среды при культивировании на сточной воде. Максимальная эффективность удаления азота (N-NH_4) и фосфора (P-PO_4) из среды составила 96,4 и 77,8 %, соответственно.

Также в работе впервые проведено исследование метаболизма микроводорослей рода *Chlorella* и *Micractinium* и выявлены отличия между ними в процессе культивирования на сточных водах в экспоненциальной и стационарной фазах роста. По данным анализа метаболических профилей, полученных методом главных компонент (см. рисунок) у четырех штаммов, относящихся к *Micractinium* sp. и *C. sorokiniana* были выявлены значительные отличия метаболических профилей в обеих фазах роста по первой главной компоненте (F1). Группировка метаболических профилей в стационарной фазе роста сопряжена с увеличением концентрации метаболитов углеводного обмена (глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата, галактозо-6-фосфата, мио-инозитол-2-фосфата, галактозил глицерола), а также щавелевой и эритроновой кислоты. Для штаммов с высоким содержанием липидов отмечена тенденция к более высокому содержанию углеводов в стационарной фазе роста, в частности, у штамма *Micractinium* sp. IC-76 отмечено десятикратное увеличение содержания сахарозы.

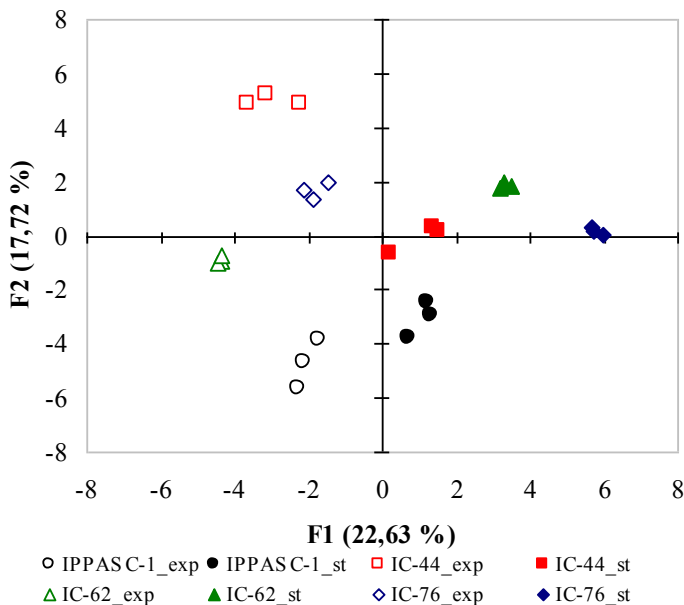


График счетов в пространстве первой (F1) и второй (F2) главных компонент, полученный в результате анализа метаболомных профилей микроводорослей методом главных компонент:
 exp — экспоненциальная фаза роста (4 сутки),
 st — стационарная фаза роста (15 сутки)

Таким образом, в работе получен штамм *Micractinium* sp. IC-76, обладающий высоким содержанием липидов (36,3 %) с высокой насыщенностью потенциально применимый для использования в очистке муниципальных сточных вод и для получения биодизельного топлива, а также штамм, обладающий высоким содержанием крахмала *Parachlorella kessleri* IC-11 (28,6 %), потенциально применимый для получения биоэтанола.

Литература

1. OECD Guidelines for Testing of Chemicals Simulation Tests — Aerobic Sewage Treatment. in: Technical Report, OECD Publishing. Paris, 1996 — P. 19–142
2. Stein, J. R. Handbook of phycological methods culture methods and growth measurements. — Cambridge University Press, 1980. 448 p.
3. Branyikova I., Marsalkova B., Doucha J., Branyik T., Bisova K., Zachleder V., Vitova M. Microalgae — novel highly efficient starch producers. Biotechnol Bioeng, 2011. — V.108. — P. 766–76.

ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА: ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, АНАЛИЗ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ*

MILK EXOSOMES: TECHNOLOGY OF ISOLATION, ANALYSIS OF PROTEIN AND NUCLEIC ACIDS

Л. В. Пурвиньш, С. Е. Седых, Г. А. Невинский

*Новосибирский государственный университет
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН*

L. V. Purvinsh, S. E. Sedykh, G. A. Nevinsky

Novosibirsk State University, SB RAS ICBFM, Russia

E-mail: ladapurvinsh13@gmail.com

Аннотация

В настоящее время особый интерес вызывают прикладные исследования экзосом как переносчика диагностически значимых белков и нуклеиновых кислот между клетками, а также как перспективных систем для направленной доставки лекарственных препаратов в организме. В связи с этим основной задачей является разработка эффективной технологии выделения экзосом из различных биологических жидкостей. Важно, чтобы технология выделения позволяла получать необходимое количество материала без примесей для анализа экзосомального содержимого. Использование сложных биологических жидкостей, как молоко, имеет смысл для создания универсального метода выделения экзосом из разных источников.

Настоящая работа включает в себя новые подходы в дополнение к стандартному протоколу выделения экзосом для получения из молока высокоочищенных препаратов экзосом. Исследование белков показало, что использование дополнительных стадий очистки, таких как гель-фильтрация и аффинная хроматография, способствует значительному уменьшению определяемых белков в препаратах. Анализ белкового и нуклеинового состава экзосом молока может способствовать созданию новых подходов для диагностики и терапии.

Abstract

The most interesting part of current studies is exosomes as a carrier of diagnostically significant proteins and nucleic acids between cells and as promising systems for targeted

© Л. В. Пурвиньш, С. Е. Седых, Г. А. Невинский, 2018.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-10055).

drug delivery in the body. Based on this, the main task of exosome studies is the development of effective exosome isolation technology from various biological fluids. It is important that the technology contributes to obtaining the necessary amount of material without impurities for the exosomal content analysis. The using of complex biological fluids, like a milk, makes sense to create a universal exosome isolation method from different sources.

This work includes new modifications of the standard exosome isolation protocol to obtain the highly purified preparation of exosomes from milk. The protein analysis showed that the using of additional purification stages such as gel-filtration and affinity chromatography contribute to a significant decrease of determined proteins in the preparations. Analysis of protein and nucleic composition of milk exosomes can facilitate to the creation of new approaches for diagnosis and therapy.

Небольшие размеры экзосом, а также их способность преодолевать биологические барьеры и осуществлять естественный транспорт биомолекул между клетками делают их идеальным кандидатом для разработки новых диагностических и терапевтических средств. Использование молока в качестве модельного объекта для создания технологии выделения экзосом позволит разработать универсальный способ выделения для разнообразных по сложности и составу биологических жидкостей.

Молоко млекопитающих является уникальным источником экзосом, которые на данный момент недостаточно изучены. Выделение экзосом из данной биологической жидкости стандартным методом с использованием только ультрафильтрации и ультрацентрифугирования не приводит к полному разделению везикулярных структур и белковых примесей. В связи с этим, мы использовали дополнительные стадии очистки препаратов экзосом, такие как гель-фильтрация и аффинная хроматография. Основываясь на данных просвечивающей электронной микроскопии, разработанный нами подход позволяет получать высокоочищенные препараты везикулярных структур из молока человека, лошади, коровы. Иммуноцитохимическим окрашиванием с использованием антител к основным поверхностным белкам экзосом: CD9, CD81, CD63 было подтверждено, что полученные везикулы являются экзосомами.

Показано, что число белков в препаратах экзосом, выделенных с помощью стандартного протокола и препаратах с дополнительной очисткой, существенно различаются. В процессе гель-фильтрации происходит отделение везикул от основных молочных белков, в частности от казеинов. Данные результаты свидетельствуют о том, что, вероятно, множество белков, определяемых ранее как экзосомальные, являются просто совыделяющимися, и при качественной очистке препаратов экзосом не выявляются.

Исследование нуклеинового состава высокоочищенных препаратов экзосом показало, что в экзосомах присутствуют основные молочные ми-

кроРНК. В дальнейшем, определение уникальных РНК, присутствующих исключительно в экзосомах, может помочь для разработки высокопроизводительного способа определения содержания экзосом в препаратах.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что при правильной технологии выделения молоко служит перспективным источником экзосом, которые могут быть использованы для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ШТАММА CHROMOHALOBACTER SP. TC193
ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОСИНТЕЗА ЭКТОИНА ***

OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR INCREASE
OF THE ECTOINE BIOSYNTHESIS BY STRAIN
CHROMOHALOBACTER SP. TC193

А. А. Пьянкова, Л. Н. Ананьина

*Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук —
филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия*

A. A. Pyankova, L. N. Anan'ina

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of
the Russian Academy of Sciences — a branch of the Federal State Budgetary
Institution of Science of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch
of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

Аннотация

Исследовано влияние температуры и разной солености среды культивирования на накопление клетками штамма *Chromohalobacter* sp. TC193 эктоина. Наиболее высокая внутриклеточная концентрация эктоина детектировалась в клетках исследуемого штамма, выращенных в минеральной среде с глюкозой в качестве источника углерода и энергии в присутствии 100 г/л хлорида натрия при 28 °С.

Abstract

The influence of temperature and different salinity of the culture medium on the ectoine accumulation by *Chromohalobacter* sp. TC193 cells were investigated. The highest intracellular ectoine concentration was detected in the cells of the strain under study, grown in a mineral medium with glucose as sole source of carbon and energy at the presence of 100 g / l sodium chloride at 28 °C.

Высокая совместимость с биологическими системами, отсутствие токсичности, стабилизирующие макромолекулы (ферменты, ДНК и РНК, мембраны) свойства и клеткозащитное действие делают эктоин многообещающим кандидатом для применения в различных биотехнологических целях,

© А. А. Пьянкова, Л. Н. Ананьина, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках проекта № 17-44-590178.

например, в косметической промышленности (в частности, в средствах по уходу за кожей), фармацевтической промышленности и медицине [1]. В связи с этим ведется активный поиск бактерий продуцентов эктоина. Известно, что штамм *Chromohalobacter salexigens* DSM3043^T для выживания в условиях повышенного содержания солей поддерживает осмотический баланс за счет синтеза *de novo* «совместимых веществ», основным из которых является эктоин [2]. На настоящий момент нет сведений о патогенности бактерий рода *Chromohalobacter*, они не требуют сложных питательных сред и условий культивирования и потому являются перспективными для применения в биотехнологических процессах продукции эктоина.

Целью настоящей работы явилось определение оптимальных условий биосинтеза эктоина клетками штамма *Chromohalobacter* sp. TC193, филогенетически близкородственного виду *Ch. japonicus* 43^T (AB105159) и удаленного от детально изученного вида *Ch. salexigens* DSM3043^T.

Объектом исследования служил изолят TC193 (=N3), ранее выделенный из образца соляной корки солеотвала БКПРУ-1 предприятия ПАО «Уралкалий» (г. Березники, Пермский край). Проведена молекулярно-генетическая характеристика исследуемой бактериальной культуры с применением методов секвенирования гена 16S рРНК и Rep-типирования геномов. Установлено, что исследуемая бактерия имеет наиболее высокий уровень 16S рДНК-сходства, составляющий 99.92 %, с видом *Ch. japonicus* 43^T (AB105159). Однако Rep-ПЦР профили изолята TC193 отличались от типового штамма вида *Ch. japonicus* 43^T. Методом ПЦР на ДНК-матрице исследованного штамма с применением праймеров, комплементарных *ect*-генам галокококков [3], получен фрагмент ожидаемой длины около 1200 п.н. Сравнение нуклеотидных последовательностей амплифицированного фрагмента *ect*-оперона выделенного штамма с таковыми из базы данных GenBank выявило их сходство 99.7 % с *ect*-генами *Ch. japonicus* CJ (CDGZ01000011.1).

Культивирование штамма проводили в 100 мл минеральной среды Раймонда [4] с глюкозой (1 г/л) в качестве источника углерода и энергии в колбах объемом 250 мл на орбитальном шейкере УВМТ-12-250 при 100 об/мин при следующих условиях: в присутствии 50 г/л хлорида натрия до фазы стационарного роста при 28 °С, 37 °С и 40 °С; в присутствии 10, 100, 150 г/л хлорида натрия до фазы стационарного роста при 28 °С; а также в присутствии 50 г/л хлорида натрия до середины фазы логарифмического роста при 28 °С. Экстракцию органических соединений из клеток и последующий анализ проводили согласно методике, описанной Schubert et al. [5]. Идентификацию эктоина проводили по хроматографическому времени удерживания при сравнении с коммерческим препаратом (Fluka, Германия).

Количественное содержание эктоина в экстрактах рассчитывали с помощью пакета программ «LCsolution» (Shimadzu, Япония).

Исследование кинетики роста штамма *Chromohalobacter* sp. TC193 при разной солености среды выявило высокие ростовые показатели в присутствии 50–100 г/л хлорида натрия в среде культивирования. Наиболее высокое внутриклеточное количество эктоина было отмечено при выращивании бактерии в присутствии 100 г/л NaCl и составило 1.65 ± 0.21 мкмоль/мг сухого веса. Дальнейшее увеличение концентрации хлорида натрия до 150 г/л в среде культивирования привело к возрастанию продолжительности lag-периода, снижению скорости роста и значений максимальной оптической плотности, но не привело к возрастанию внутриклеточной концентрации эктоина. Однако в клеточных экстрактах был обнаружен гидроксиэктоин. Установлено влияние температуры на рост исследуемого штамма: увеличение температуры с 28 °C до 40 °C ингибировало рост. Кроме того, уже при культивировании исследуемого штамма при 37 °C было отмечено снижение внутриклеточного пула эктоина с 0.905 ± 0.007 (28 °C) до 0.61 ± 0.03 мкмоль/мг сухого веса. Зависимости внутриклеточной концентрации эктоина от стадии роста штамма *Chromohalobacter* sp. TC193 не выявлено.

Таким образом, полученные результаты могут быть основой для разработки условий культивирования штамма *Chromohalobacter* sp. TC193 в биотехнологии промышленного получения эктоина.

Литература

1. Lentzen G., Schwarz T. Extremolytes: natural compounds from extremophiles for versatile applications. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 72, № 4. P. 623–634.
2. Pastor J. M. et al. Role of central metabolism in the osmoadaptation of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288, № 24. P. 17769–17781.
3. Ананьина Л. Н., Плотникова Е. Г. Новая система олигонуклеотидов для амплификации *ect*-генов бактерий семейства *Halomonadaceae* // Вестник уральской медицинской академической науки. 2011. Т. 4, № 1. С. 17–18.
4. Plotnikova E. G. et al. *Thalassospira permensis* sp. nov., a new terrestrial halotolerant bacterium isolated from a naphthalene-utilizing microbial consortium. // Mikrobiologiya. 2011. V. 80, № 5. P. 691–699.
5. Schubert T. et al. Continuous synthesis and excretion of the compatible solute ectoine by a transgenic, nonhalophilic bacterium // Appl. Environ. Microbiol. 2007. V. 73. P. 3343–3347.

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ АНЕСТЕЗИИ ЖИВОТНЫМ-ПРОДУЦЕНТАМ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК

APPLICATION OF DIFFERENT KINDS OF ANESTHESIA TO ANIMALS-PRODUCERS OF DIAGNOSTIC SERUMS

**В. В. Рогожин, М. В. Овчинникова, Т. Ю. Кириллова,
А. П. Семакова, В. Г. Германчук**

**V. V. Rogozhin, M. V. Ovchinnikova, T. Yu. Kirillova,
A. P. Semakova, V. G. Germanchuk**

Аннотация

Существующие в настоящее время методы тотального забора крови у продуцентов-кроликов, без применения какого-либо вида наркоза, не соответствуют биоэтическим нормам, которые отражены в документах организации по экономическому сотрудничеству и развитию (OECD) и составляют основу Директив Совета Европы 98/34/ЕЭС, 67/548/ЕЭС, 86/609/ЕЭС о необходимости гуманизации экспериментов с использованием лабораторных животных.

Abstract

Existing at this moment methods of total blood sampling from rabbits-producers without application of any kind of anesthesia does not match bioethical norms, which indicated in documents of organization economical cooperation and development (OECD) and form the basis of Directives Europe Council about necessity of humanization of experiments with lab animals.

Цель

Изучение возможности использования различных методов анестезии при проведении манипуляций по тотальному забору крови у животных-продуцентов диагностических сывороток.

Материалы и методы: кролики породы «Шиншилла» массой 2,5–3,0 кг. Ингаляционный анестетик Изофлуран в концентрации 3,5 % в сочетании с 0,8 % чистого кислорода, миорелаксационное средство для парентерального введения ксилазин из расчета 0,2 мл/кг, а также анестезирую смесь из препаратов общей анестезии — золетила и ксилы. Для ингаляционного введения использовали наркозный аппарат Moduflex (Dispomed), индукция

в наркоз составила 5–7 мин, поддержание анестезии велось на протяжении всей процедуры тотального взятия крови; ксилазин вводили внутримышечно, время достижения миорелаксационного эффекта составляло от 10 до 15 мин.; анестезирующую смесь вводили внутривенно в краевую вену уха, время введения животного в наркоз составляло 1–3 мин. Контроль специфической активности полученной иммунных сывороток осуществляли в обратной реакции агглютинации.

В ходе проведения ингаляционной и парентеральной анестезии у животных ослабевали рефлексы вплоть до их полного отсутствия, незначительно понижалась температура тела, угнетался сердечный ритм, у некоторых продуцентов снижался кровоток. Однако, внутримышечная анестезия приводила к ослаблению болевой чувствительности на непродолжительное время, которого было недостаточно для проведения процедуры кровопускания, следовательно, использование ксилазина в качестве анестетика для тотального забора крови, не рекомендуется.

Продолжительный анестезирующий эффект от внутривенного введения смеси ксилы и золетила поддерживал кролика в состоянии полной анестезии на протяжении всей процедуры по забору крови. Специфическая активность иммунных сывороток соответствовала требованиям нормативной документации. Таким образом, определена целесообразность применения ингаляционного вида анестезии, а так же комбинации из препаратов ксилы и золетила при проведении тотального забора крови у кроликов-продуцентов диагностических сывороток.

**КОЭКСПРЕССИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ
БАКТЕРИИ *UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS*
С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ШАПЕРОНАМИ В *E. COLI*
И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЕ СВОЙСТВ***

CO-EXPRESSION OF THERMOSTABLE ESTERASE FROM
UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS WITH MOLECULAR
CHAPERONES IN *E. COLI* AND STUDY OF ITS PROPERTIES

Ю. В. Самойлова¹, А. В. Пилигаев¹, К. Н. Сорокина^{1,2}, В. Н. Пармон^{1,2}

¹ ФГБУН Институт катализа им. Г. К. Борескова СО РАН

² Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет

Y. V. Samoylova¹, A. V. Piligaev¹, K. N. Sorokina^{1,2}, V. N. Parmon^{1,2}

¹ Boreskov Institute of Catalysis SB RAS, Russia

² Novosibirsk State University, Russia

Аннотация

В работе была проведена разработка продуцентов новой термостабильной эстеразы estUT1 бактерии *Ureibacillus thermosphaericus*, получаемой ко-экспрессией с молекулярными шаперонами *E. coli* и *Devosia psychrophila*. Коэкспрессия с шаперонами *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) и триггерным фактором *D. psychrophila* привела к увеличению продукции эстеразы в растворимой фракции белка до $22,6 \pm 1,3$ ЕА и $25,2 \pm 0,8$ ЕА, соответственно, по сравнению с эстеразой, экспрессированной без шаперонов ($15,6 \pm 0,2$ ЕА). На основе выделенного фермента был получен биокатализатор в виде поперечно-сшитых агрегатов белка и были исследованы его свойства.

Abstract

In this study the new thermostable esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* was co-expressed with molecular chaperones of *E. coli* and psychrophilic bacteria *Devosia psychrophila*. Co-expression of esterase with an *E. coli* chaperones (KJE, ClpB, and ELS) or with the trigger factor of *D. psychrophila* increased the yields of soluble protein up to $22,6 \pm 1,3$ U and $25,2 \pm 0,8$ U, respectively, as compared to esterase expressed without chaperones ($15,6 \pm 0,2$ U). The soluble protein fraction was used for preparation of cross-linked enzyme aggregates and used as a biocatalyst for hydrolysis of organophosphate insecticide malathion.

Биокатализаторы на основе термостабильных липолитических ферментов широко применяются в пищевой и фармацевтической промышленности для получения модифицированных пищевых жиров, ароматических соединений и фармацевтических интермедиатов. Основным недостатком их применения является высокая стоимость получения липолитических ферментов, продуцируемых рекомбинантными штаммами микроорганизмов, которые являются активным компонентом биокатализаторов.

В данной работе для повышения продукции новой термостабильной эстеразы estUT бактерии *U. thermosphaericus* в *E. coli* была проведена ее коэкспрессия с молекулярными шаперонами *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) и с триггерным фактором (TF) психрофильной бактерии *D. psychrophila* в клетках *E. coli* BL21(DE3). Конструкция, несущая ген TF *D. psychrophila*, была получена на основе плазмиды pBB540. Коэкспрессия с молекулярными шаперонами *E. coli* (KJE, ClpB и ELS) привела к увеличению продукции эстеразы в растворимой фракции клеточного лизата с 1 мг белка с $15,6 \pm 0,2$ до $22,6 \pm 1,3$ ЕА. Коэкспрессия TF *D. psychrophila* с EstUT1 также привела к увеличению продукции фермента до $25,2 \pm 0,8$ ЕА.

Исследование свойств фермента показало, что выделенная эстераза отличается оптимумом активности при 70–80 °C и pH 8,0, специфично гидролизует сложные эфиры короткоцепочечных жирных кислот (C_2 – C_8). EstUT1 показала высокую каталитическую эффективность при гидролизе малатиона ($K_M = 19,5 \pm 1,1$ мкМ) и стереоспецифичность в отношении (S)-энантиомера кетопрофена ($ee_p = 35,3$ %). Таким образом, многообразие свойств термостабильной эстеразы EstUT1 позволяет использовать ее в различных процессах, основанных на гидролизе соединений со сложно-эфирной связью.

Полученный белок был использован для приготовления и исследования биокатализатора методом CLEA (cross-linked enzyme aggregates); активность полученного биокатализатора составила $29,4 \pm 0,5$ ЕА/мг. Было установлено, что в ходе иммобилизации эстеразы значительно повысилась ее стабильность при pH 5–9, 50–80 °C, причем времена полуинактивации фермента после иммобилизации при 50 и 60 °C увеличились в 1,9 и 1,5 раз и стали равны 31,3 и 22,5 ч, соответственно. Исследование влияния различных веществ на фермент выявило более высокую стабильность иммобилизованной эстеразы по сравнению со свободной и в присутствии 10 мМ растворов ФМСФ, ДТТ, 2-меркаптоэтанола, а также 1 % растворов SDS и Твин 20 ее активность стала больше в 1,9, 1,2, 1,2, 1,5 и 1,6 раз, соответственно. Биокатализатор на основе эстеразы estUT1 был протестирован в реакции гидролиза малатиона (О,О-диметил-S-(1,2-дикарбэтоксиэтил)дитиофосфат), причем в последнем случае биокатализатор показал высокую операцион-

ную стабильность: после 25 циклов (350 ч) реакции при температуре 37 °C степень гидролиза малатиона составила $78,1 \pm 3,1$ %.

Таким образом, в работе была увеличена продукция рекомбинантной термостабильной эстеразы бактерии *U. thermosphaericus* коэкспрессией с молекулярными шаперонами и получен биокатализатор на ее основе методом CLEA. Повышенная стабильность CLEA-estUT1 в денатурирующих условиях делает его перспективным биокатализатором для различных биотехнологических процессов на основе гидролиза соединений со сложноэфирными связями.

**БИСПЕЦИФИЧНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ:
СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ*****BISPECIFIC ANTIBODIES: METHODS OF PRODUCTION
AND PERSPECTIVES OF USE**

С. Е. Седых, Г. А. Невинский

*Новосибирский государственный университет
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН*

S. E. Sedykh, G. A. Nevinsky

*Novosibirsk State University, Russia
SB RAS ICBFM, Russia*

E-mail: sedyh@niboch.nsc.ru

Аннотация

Биспецифичные антитела содержат два разных антигенсвязывающих центра и способны связывать два разных антигена. Журнал *Nat Rev Drug Disc* назвал в 2014 году эти молекулы «антителами нового поколения» из-за перспектив их использования в качестве терапевтических агентов. Предложено более 50 различных платформ для получения биспецифичных антител.

Abstract

Bispecific antibodies contain two different antigen-binding centers and may bind to two distinct antigens simultaneously. Nature Reviews Drug Discovery named this molecules in 2014 — “next generation antibodies” due to their prospects for use as therapeutic agents. There are proposed more than 50 different platforms for bispecific antibodies productions.

В настоящее время разрешены к медицинскому использованию два препарата биспецифичных терапевтических антител — блинатумомаб и катумаксомаб. Эти препараты направлены на лечение «жидких» опухолей, рака крови (лейкемии и лимфомы). В настоящее время более 60 молекул биспецифичных антител находятся в клинических испытаниях, более 140 разрабатываются и находятся на стадии доклинических испытаний. Терапевтиче-

© С. Е. Седых, Г. А. Невинский, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке РФФИ 16-34-60066 мол_а_дк, Гранта Президента РФ молодым кандидатам наук МК-410.2017.4.

ские биспецифичные антитела разрабатываются для лечения аутоиммунных (например, артриты, астма, диабет), инфекционных (например, пневмония) и других заболеваний (например, гемофилия и болезнь Альцгеймера).

Разработка новых подходов для получения биспецифичных антител позволила получить различные варианты перспективных для терапевтического использования производных иммуноглобулинов. Получаемые молекулы отличаются от природных IgG по фармакокинетике, времени полужизни в крови, способности проникать в опухоль, по размерам, валентности и наличию Fc. Блокирование сразу нескольких биологических путей позволяет БсАТ проявлять синергический эффект, недостижимый при введении смеси моноспецифических молекул. Работы последних лет указывают на то, что в перспективе будут получены молекулы, получаемые комбинациями разработанных ранее методов, направленные на лечение самых разных заболеваний, при которых ключевую роль может играть одновременное связывание нескольких специфических антигенов.

Природные биспецифичные иммуноглобулины обнаружены в молоке, плаценте и крови здоровых доноров. Ранее нами показано, что химерные биспецифичные молекулы IgG из этих источников представлены всеми подклассами (IgG1-IgG4), определено содержание биспецифичных IgG, а также соотношение биспецифичных IgG к моноспецифичным.

Показано, что обнаруженные 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 на возможную роль обмена HL-фрагментами при беременности и лактации и на перспективы использования данного процесса для получения искусственных биспецифичных антител.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ЛАССА В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ

PRODUCTION OF RECOMBINANT LASSA VIRUS ANTIGENS IN A PROCARYOTIC EXPRESSION SYSTEM

С. С. Скрипкин^{1,2}, И. Р. Иматдинов¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

² ФГБОУ ВПО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

S. S. Skripkin^{1,2}, I. R. Imatdinov¹

FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

² Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia

E-mail: skripkin.stan@gmail.com

Аннотация

Вирус Ласса — распространенный в странах Западной Африки РНК-содержащий вирус, представитель семейства *Arenoviridae*. Вирус Ласса относится к микроорганизмам I группы патогенности.

На данный момент терапия включает в себя симптоматическое лечение и применение нуклеозидного аналога рибавирина (1-p-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide). Лицензированных вакцинных препаратов против лихорадки Ласса в настоящее время не существует.

Abstract

Lassa virus is RNA virus belonging to the family of *Arenaviridae*, distributed in West African countries. Lassa virus is included to the organisms of the I pathogenicity group.

Currently, therapy includes symptomatic treatment and the use of guanosine analog ribavirin (1-p-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide). So far, vaccine against Lassa fever does not exist.

В Западной Африке ежегодно инфицируются вирусом Ласса от 2 до 3 млн. человек, из них от 5 до 10 тыс. погибает (Fichet-Calvet E., Rogers D. J., 2009). В 80 % случаев болезнь протекает бессимптомно. В остальных — характеризуется тяжелым течением, включающим повышение температуры тела до 40°C, слабость, мышечную и головную боль, тошноту, рвоту и геморрагический синдром. Выявление людей, инфицированных вирусом Ласса, ослож-

нено клиническими проявлениями, характерными для других вирусных геморрагических лихорадок (Эбола, Марбург, Мачупо, денге, желтая лихорадка и другие).

Выбор прокариотической системы экспрессии на основе *E. coli* основан на доступности широкого спектра лабораторных штаммов, безопасности, низкой стоимости питательных сред и высоком уровне продукции целевых белков.

Показано, что поверхностный гликопротеин, а также нуклеопротеин вируса Ласса обладают иммуногенными свойствами. Целью данной работы являлось получение рекомбинантных антигенов вируса Ласса в прокариотической системе *E. coli*.

Разработка серодиагностикумов, позволяющих дифференцировать инфицированных (серокомплекс Ласса-лимфоцитарный хориоменингит (группа Старого Света)) от вакцинированных кандидатными препаратами людей, основывается на применении двух иммунодоминантных антигенов вируса Ласса GP1 и NP.

Получены 4 конструкционных варианта экспрессионных векторов (pQE-30/GP1; pQE-30/NP; pET32a/GP1 и pET32a/NP) с оптимизированными нуклеотидными последовательностями, кодирующими целевые антигены, в двух штаммах *E. coli* (Rosetta2(DE3)pLysS и SG13009[pREP4]), отработаны условия культивирования, индукции экспрессии, лизиса, проведена сравнительная оценка выхода химерных белков в SDS-PAGE электрофореze. Установлено, что все рекомбинантные вектора в соответствующих хост-штаммах обеспечивают высокий уровень синтеза целевых белков.

Последующая очистка рекомбинантных белков будет проведена с использованием Ni-хелатной аффинной хроматографии, с «полировкой» на СНТ Ceramic Hydroxyapatite.

Антигены вируса Ласса пригодны для получения гипериммунных сывороток крови, в качестве антигенов для постановки серологических реакций (ТФ ИФА, иммуноблоттинг и т. д.), в научно-исследовательских работах при изучении антитело-зависимого усиления инфекции, перекрестного иммунного ответа и т. д.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ**

**EXTRACTION AND PURIFICATION OF PROTEASES
FROM DEER PANCREATIC**

А. А. Стучаева, Н. В. Глазова

*Санкт-Петербургский государственный
химико-фармацевтический университет*

A. A. Stuchaeva, N. V. Glazova

St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University

E-mail: anna.stuchaeva@pharminnotech.com

Аннотация

Данная работа посвящена подбору условий экстракции и осаждения протеаз из поджелудочной железы северного оленя, а также изучению параметров сорбции протеаз из экстракта поджелудочной железы северного оленя.

В результате проделанной работы были подобраны условия экстракции и осаждения протеаз из поджелудочной железы северного, выбран оптимальный сорбент для сорбции протеаз из экстракта поджелудочной железы северного оленя, оленя.

Abstract

This work is dedicated to exploration of sorption parameters of deer pancreatic, choosing of optimal sorption parameters for model chymopsin solution both in statics and dynamics, choosing of parameters for extraction and deposition from deer pancreatic.

As a result there were chosen the optimal sorbent for sorption of proteases from deer pancreatic. Also there were chosen parameters for extraction and deposition of proteases from deer pancreatic.

Целью работы является разработка методики выделения и очистки протеаз из поджелудочной железы северного оленя. Протеазы из поджелудочной железы выделяли экстракционным методом. Экстракция проводилась 0,25н серной кислотой с добавлением перлита. Осадок протеаз получали методом высаливания, серноокислым аммонием при степени насыщения 0,7.

Был проведен гельхроматографический и электрофоретический анализ экстракта, осадка и надосадочной жидкости, а так же проведено сравнение экстракта, полученного из поджелудочной железы крупного рогатого скота и северного оленя.

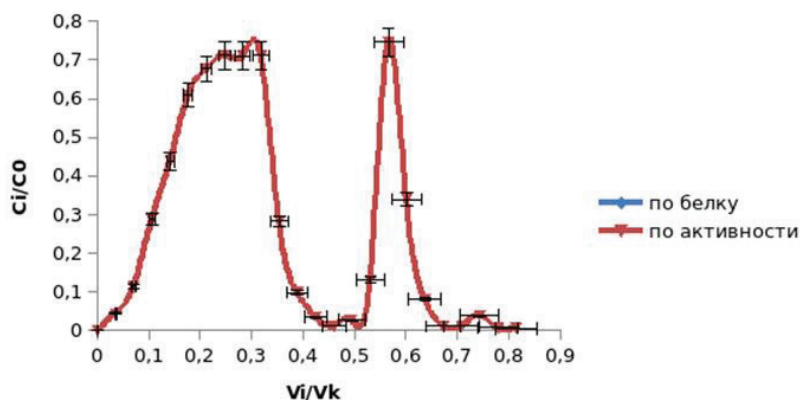
Результаты сравнения представлены в таблице.

Сравнение ферментного состава экстрактов КРС и северного оленя

Фермент	Поджелудочная КРС	Поджелудочная северного оленя
Трипсин	+	+
Химотрипсин	+	+
ДНКаза	+	-
РНКаза	+	В незначительном количестве

В поджелудочной железе крупного рогатого скота протеолитические ферменты содержатся в виде неактивных предшественников, что позволяет получить нуклеазы (ДНКазу и РНКазу). Активные протеазы в экстракте поджелудочной железы северного оленя разрушают другие ферменты. РНКазы, за счет более низкой молекулярной массы обладает большей устойчивостью, чем ДНКазы, и в незначительном количестве сохраняется в экстракте, в то время как ДНКазы разрушаются полностью.

Ранее для сорбционной очистки ферментов использовался сорбент КУ-23[1]. В данной работе был подобран оптимальный аналог сорбента



Выходная кривая сорбции и десорбции протеаз
из раствора осадка на сорбенте Purolite-C150

KY-23 среди сорбентов сорбентов: Purolite-C160, Purolite-C150, Purolite-C115E, PurosorbPAR910. В результате изучения процессов сорбции и десорбции протеаз из поджелудочной железы северного оленя оптимальным сорбентом оказался Purolite-C150.

Выход на стадии десорбции составил 83 %.

Выводы

- Подобраны условия экстракции и осаждения протеаз из поджелудочной железы северного оленя.
- Получен экстракт из поджелудочной железы северного оленя, проведен сравнительный анализ экстрактов поджелудочной железы северного оленя и поджелудочной железы крупного рогатого скота.
- Проведена сорбция протеаз из поджелудочной железы северного оленя на оптимальном сорбенте.

Литература

1. Рудометова, Н. В. Разработка сорбционно-хроматографического выделения панкреатических ферментов: диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук: / Н. В. Рудометова; СПбТИ. — СПб., 1994. — 138 с.

**БЫСТРОЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ
МУТАЦИЙ ГЕНА *rpoB* И *katG* В КЛИНИЧЕСКИХ
ИЗОЛЯТАХ *M. TUBERCULOSIS*
С ПОМОЩЬЮ HAIN MTB/DR SL
У ДЕТЕЙ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ ***

С. А. Султанов¹, З. А. Сайфудинов²

*¹ Республиканский специализированный научно-практический
медицинский центр фтизиатрии и пульмонологии*

*² Республиканский специализированный научно-практический
медицинский центр фтизиатрии и пульмонологии*

E-mail: sani_sultanov@mail.ru

Аннотация

Существует все возрастающая потребность в разработке быстрых методов лабораторных исследований для борьбы с угрозой случаев туберкулеза с лекарственной устойчивостью (МЛУ-ТБ) среди детей во всем мире (ВОЗ, 2018). Сегодня многие открытия проводятся для исследования типа и частоты мутаций в генах *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) *rpoB* и *katG* в резистентных штаммах к рифампицину (Rif) и изониазиду (Inh) соответственно. По оценкам, в 2017 г. МЛУ-ТБ развился у 500 000 человек в мире. Еще 115 000 человек с ТБ, устойчивым к Rif, также отвечают установленным недавно критериям для лечения МЛУ-ТБ (ВОЗ, 2017). Особую роль в росте среди детей с МЛУ-ТБ занимают дети, зараженные ВИЧ-инфекцией (ВОЗ, 2018).

Цель исследования

Установить роль полимеразной цепной реакции (ПЦР) в диагностики мутаций в генах *rpoB* и *katG*.

Материалы и методы

Было проведено генотипическое тестирование восприимчивости к ЛУ штамма MTB, а именно из 50 патологических материалов (мокрота) взятых у детей с ТБ/ВИЧ. Технологии для генотипического тестирования восприимчивости была выбрана HAIN MTB/DR SL для выявления резистентных к ЛУ-ТБ в изолятах при низкой ресурсной настройке.

Результаты

Анализы мокроты, взятые у детей с ТБ|ВИЧ, показали следующие результаты, а именно, ЛУ к препаратам первого ряда была детектирована у 14(28 %) детей с ТБ/ВИЧ, а именно у 8(57 %) к Rif, у 6(43 %) к Inh. Мутации в генах *groV* были обнаружена наиболее часто у кодонов 531, 526 и 516 (59,83 %, 45,29 % и 22,22 % соответственно), что свидетельствует о наличие ЛУ к Rif. Частота мутаций в гене *katG* была обнаружена у кодона 315 среди 82,95 % изолятов ТБ устойчивых к Inh.

Выводы

HAIN MTB/DR SL обнаружил мутации *groV* и *katG* в фенотипически устойчивых изолятах с чувствительностью 93 % и 83 %. Анализы HAIN MTB/DR SL могут быть использованы для быстрого обнаружения МЛУ-ТБ в течение 24 часов.

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИФУНГАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ПОЛИЕНОВОВОГО АНТИБИОТИКА РОЗЕОФУНГИНА
В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
КАНДИДОЗНОГО ВУЛЬВОВАГИНИТА**

**STUDY ON ANTIFUNGAL PROPERTIES OF POLYENE ANTIBIOTIC
ROSEOFUNGIN AGAINST CLINICAL PATHOGENS
OF CANDIDAL VULVOVAGINITIS**

А. Ж. Султанова, А. И. Тумабаева, А. Ш. Жуатай,
Н. Н. Жаксылыков, Г. Е. Тугелбай

ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», Алматы, Казахстан

A. Zh. Sultanova, A. I. Tumabaeva, A. Sh. Zhautay,
N. N. Zhaksylykov, G. E. Tugelbay

*LLP Scientific Production Center for Microbiology
and Virology, Almaty, Kazakhstan*

E-mail: imv_rk@list.ru

Аннотация

С целью создания новой лекарственной формы для лечения кандидозного вульвовагинита изучена активность полиенового антибиотика розеофунгина в отношении 15 клинических штаммов грибов рода *Candida*: *Candida albicans* (9 штаммов), *Candida krusei* (2 штамма), *Candida tropicalis* (2 штамма), *Candida glabrata* (1 штамм), *Candida parapsilosis* (1 штамм). Антибиотик розеофунгин проявил высокую антифунгальную активность в отношении клинических возбудителей кандидозного вульвовагинита, минимальная подавляющая концентрация изменялась в пределах 1,66–2,5 мкг/мл.

Abstract

In order to develop a new dosage form for the treatment of candidal vulvovaginitis, the activity of the polyene antibiotic roseofungin was examined against 15 clinical fungal strains of *Candida* species: *Candida albicans* (9 strains), *Candida krusei* (2 strains), *Candida tropicalis* (2 strains), *Candida glabrata* (1 strain), and *Candida parapsilosis* (1 strain). The antibiotic roseofungin showed a high antifungal activity against clinical pathogens of candidal vulvovaginitis, the minimum inhibitory concentration was in the range of 1.66–2.5 µg/mL.

Кандидозный вульвовагинит относится к инфекционным заболеваниям, вызывающим воспаление слизистой оболочки вульвы и влагалища дрожжеподобными грибами рода *Candida* на фоне снижения иммунного статуса. Лечение и профилактика кандидозного вульвовагинита в настоящее время является актуальной проблемой в гинекологии. Это заболевание занимает лидирующее положение среди вагинальных инфекций, т.к. практически каждая женщина имела хотя бы один эпизод данного заболевания в течение жизни, а у более 70 % женщин возникали рецидивы.

В настоящее время насчитывается более 170 видов *Candida*, из которых не более двух десятков видов регистрируются как возбудители инфекций у человека. Несмотря на то, что *Candida albicans* является наиболее распространенной причиной вульвовагинального кандидоза, частота этого заболевания, вызванного другими видами *Candida*, такими как *C. tropicalis*, *C. glabrata* и *C. krusei*, увеличивается, особенно у ВИЧ-инфицированных женщин.

Полиены, азолы, эхинокандины, нуклеозидные аналоги и аллиламины используются с различной эффективностью для лечения инфекций, возбудителями которых являются грибы рода *Candida* в зависимости от типа и места заражения и чувствительности видов *Candida*. Широкое использование этих препаратов в качестве профилактических и терапевтических агентов способствует появлению резистентных штаммов *Candida*, тем самым вызывая серьезные проблемы в успешном лечении вульвовагинита. При этом отмечается более высокий уровень резистентности, особенно к азолам, у большинства видов *Candida non-albicans*, многие из которых обладают природной устойчивостью к противогрибковым препаратам.

В связи с вышеизложенным, поиск новых антифунгальных лекарственных субстанций и разработка на их основе эффективных препаратов для лечения кандидозного вульвовагинита, доступных широким слоям населения, является настоятельной необходимостью.

Целью данной работы было изучение активности противогрибкового полиенового антибиотика розеофунгина в отношении клинических возбудителей кандидозного вульвовагинита и оценка возможности его использования для разработки новой лекарственной формы.

Из клинического материала больных с признаками острой и хронической кандидозной инфекции вульвы и влагалища и условно-здоровых лиц без признаков микологического заболевания, полученном в медицинских учреждениях Алматы и Алматинской области, выделены 56 изолятов грибов рода *Candida*. На их основе создана коллекция клинических возбудителей кандидоза для использования в качестве тест-организмов при разработке новой лекарственной формы медицинского препарата с использованием в качестве лекарственной

субстанции антибиотика розеофунгина. В коллекцию включены 15 штаммов грибов рода *Candida*, отнесенных в результате идентификации к 5 видам: 9 штаммов *Candida albicans*, 2 штамма *Candida krusei*, 2 штамма *Candida tropicalis*, 1 штамм *Candida glabrata*, 1 штамм *Candida parapsilosis*. Идентификацию полученных культур дрожжеподобных грибов проводили на основе изучения морфологических признаков клеток и внешнего вида выросших колоний, а также с использованием автоматического бактериологического анализатора “MINI API” фирмы “BIO MERIEUX”.

Полиеновый антибиотик розеофунгин (регистрационный номер РК-ЛС-5№023224) является новой лекарственной субстанцией, разработанной учеными Казахстана, на основе которой создана лекарственная форма противогрибкового препарата «Розеофунгин-АС, мазь 2 %» для наружного применения (регистрационный номер РК-ЛС-5№023225). Антибиотик розеофунгин проявил высокую антифунгальную активность в отношении клинических возбудителей вагинального кандидоза, минимальная подавляющая концентрация изменялась в пределах 1,66–2,5 мкг/мл. Наиболее высокой активностью антибиотик розеофунгин обладал в отношении клинических штаммов вида *Candida albicans*, МПК — 1,66–2,0 мкг/мл. Активность в отношении штаммов *Candida non-albicans* была ниже: МПК для *Candida tropicalis* составила 2,0 мкг/мл, для *Candida krusei*, *Candida glabrata* и *Candida parapsilosis* — 2,5 мкг/мл.

Наличие высокой активности у антибиотика розеофунгина в отношении клинических возбудителей кандидоза свидетельствует о возможности разработки на его основе новых лекарственных препаратов для лечения кандидозного вульвовагинита, способных улучшить состояние больных в Казахстане и за его пределами.

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВ И МОДЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ *

CHARACTERIZATION OF THE 3D HUMAN AORTIC SMOOTH MUSCLE TISSUE CONSTRUCT FOR DRUG TESTING AND DISEASE MODELS

А. А. Сульгин¹, В. Ю. Сидоров²

¹ *ФГБОУ ВО «Сибирский государственный
медицинский университет», Томск, Россия*

² *Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Vanderbilt
University, Nashville, TN, USA*

A. A. Sulgin¹, V. Y. Sidorov²

¹ *Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

² *Department of Biomedical Engineering, School of Engineering, Vanderbilt
University, Nashville, TN, USA*

Аннотация

В Университете Вандербильта была создана платформа «I-Wire», которая позволяет выращивать фибриллоподобную конструкцию «organ-on-a-chip» диаметром 350–450 мкм с возможностью использования различных типов клеток. Она не требует васкуляризации и достаточна по размеру для проведения количественных измерений как электрофизиологических реакций, так и пассивных и активных эластических свойств волокон при действии механических, электрических и фармакологических стимулах. В данной работе мы оптимизировали разработанную систему для культивирования гладкомышечной ткани сосудов и оценили механо-эластические свойства тканеинженерных конструкций.

Abstract

Scientists at Vanderbilt University have created a novel I-Wire platform that allows growing a small-diameter, cylindrical organ-on-a-chip tissue fiber construct using different types of cells. This construct does not require vascularization and is large enough to simplify quantitative measurements of both electrophysiological responses and the passive and active elastic properties of the fibers under different stimulus, mechanical loading, and drug and toxin protocols. We have optimized the developed system to culture the artificial

© А. А. Сульгин, В. Ю. Сидоров, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке Zimin Foundation «SMTB Alumni Summer Research Program Grant».

smooth muscle tissue and characterized mechano-elastic properties of the smooth muscle tissue constructs.

Введение

Недавние достижения в области тканевой инженерии дают большие возможности для воспроизведения физиологии различных типов клеток *in vitro*. Это также имеет большой потенциал для исследований в области биомедицины, включая клинические исследования лекарств и изучение сердечно-сосудистых заболеваний [1, 4, 10]. В настоящее время в большинстве экспериментальных подходов в тканевой инженерии используются традиционные двухмерные модели тканей, которые обеспечивают высокий контроль над типом клеток и позволяют контролировать плотность и состав среды, но представляют собой нефизиологическую механическую среду. Это сказывается на невозможности поддержания фенотипа первичных клеток [3] или созревания клеток, происходящих из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) [2, 5, 9]. В отличие от двумерных тканевых монослоев, спроектированная трехмерная ткань лучше воспроизводит физиологическую и механическую *in vivo* среду и, следовательно, более точно воспроизводит свойства настоящей ткани.

Материалы и методы

Тканеинженерные конструкции из гладкомышечных клеток (VSMTCs) были выращены из коммерческих гладкомышечных клеток (Primary human coronary artery smooth muscle cells, HCASMC, ThermoFisher, #C0175C) с использованием матрицы на основе фибрина при конечной плотности 10^6 клеток/мл. После конденсации и формирования вытянутых мышечных волокон (в среднем через 13–15 дней) были измерены пассивные механо-эластические свойства конструкций с использованием оптической установки на основе микроскопа.

Для вычисления модуля упругости и растяжимости VSMTCs был использован гибкий зонд из полиэфирэфиркетона с наружным диаметром 365 мкм, диаметром отверстия 120 мкм (Putnam Plastics, Dayville, CT, USA) и длиной 42 мм. Гибкий зонд были смонтированы при помощи фрикционного крепления к конденсору инвертированного светового микроскопа (Eclipse Ti, Nikon, Melville, NY, USA), оснащенного цифровой камерой (Zyla sCMOS Camera, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland). Микроскоп оснащен микроконтроллером (MS-2000 Flat-Top XYZ Automated Stage, ASI, Eugene, OR, USA), который позволяет точно перемещать предметный стол по двум измерениям. Характеристики зонда были откалиброваны и имели линейную зависимость веса относительно перемещения манипулятора.

На рис. 1 изображена схема изменения геометрии VSMTC в ходе эксперимента проводимого для определения его эластичности. Черной точкой показан конец гибкого зонда, серой линией показана ткань VSMTC. Черные стрелки направление сдвига подвижной части конструкции от первого (I) до второго (II) положения на расстояние d_s . Когда подвижная часть приходит в движение, гибкий зонд изгибается, положение наконечника смещается, и сила F_t прикладывается к VSMTC. Эта сила уравнивается двумя другими силами (F_c), которые коллинеарны верхней и нижней части VSMTC. Горизонтальные проекции двух сил F_c представляют собой два параллельных вектора, которые обозначены двумя короткими красными стрелками.

Вычисление модуля упругости производили по следующей формуле:

$$E = \frac{2L_o F_t \sqrt{(d_s - d_t)^2 + a^2}}{\pi D^2 \Delta L (d_s - d_t)},$$

где a — константа, составляющая половину длины VSMTC, d_s и d_t — значения, получаемые при измерениях, L_o — длина VSMTC, D — диаметр VSMTC, F_t — боковая растягивающая сила, ΔL — изменение длины VSMTC.

Для оценки пассивных механоэластических свойств VSMTCs были подвергнуты воздействию блеббистатина и цитохалазина D. Блеббистатин является обратимым ингибитором АТФ-азной активности миозина II [6], в то время как цитохалазин D блокирует полимеризацию актина, тем самым нарушает организацию сети филаментов [7]. Для оценки способности VSMTCs отвечать на адренергическую и холинэргическую стимуляцию были использованы среды, содержащие 1 мкМоль изопrenalина и 5 мкМоль ацетилхолина.

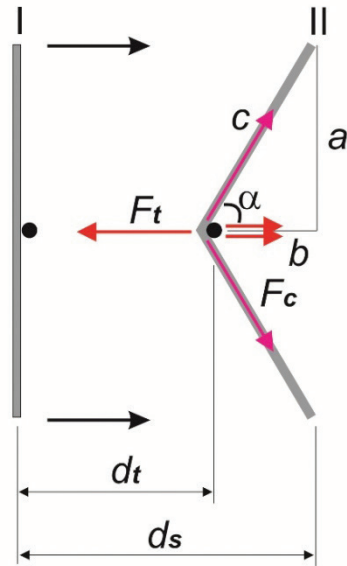


Рис. 1. Схематическое представление направления действия сил.
Взято с разрешения из [8]

Результаты

В ходе работы были выполнены контрольные измерения механо-эластических свойств VSMTCS через три и шесть дней после начала эксперимента (рис. 2, *A*, *B*). Для анализа различий механоэластических свойств была построена диаграмма деформирования (рис. 2, *A*), а затем линейная часть графика была использована для вычисления модуля упругости (рис. 2, *B*).

Существенное удлинение VSMTCS наблюдается при приложении боковой растягивающей силы больше 0.1 мН. Все три измерения показали равномерное увеличение длины VSMTCS с увеличением боковой растягивающей силы. Была вычислена сила растяжения вдоль волокна в зависимости от величины поперечно приложенной силы, а также рассчитано теоретическое растяжение при бесконечной упругости.

Модуль упругости не имел статистически значимых различий с течением времени ($F(2,10) = 0.225$, $p = 0.8$, $n = 6$). Значение модуля упругости составило 7.4 ± 1.5 кПа в начале эксперимента, 7.9 ± 1.4 кПа после 3 дней и 7.8 ± 1.9 кПа после 6 дней, соответственно.

В ходе второго эксперимента была приложена постоянная сила $F_i = 0.0712$ мН и в течение 15 минут были произведены контрольные измерения, после чего были последовательно внесены 30 мкМоль блеббистатина и 50 мкМоль цитохалазина D через 15 и 50 минут после начала эксперимента (рис. 2, *F*). Были выполнены измерения растяжения VSMTCS в контроле и после инкубации в течение 2 часов с веществами (рис. 2, *E*).

Инкубация с блеббистатином увеличило растяжение VSMTCS с 1.2% до 1.45%, а последующая обработка цитохалазином D до 1.8%, что соотносится с разницей на кривой растяжения (рис. 2, *E*) — увеличение растяжимости на 0.8% относительно контроля при $F_i = 0.0712$ мН.

Применение изопреналина вызывало статистически значимое уменьшение растяжимости при $F_i > 0.05$ мН ($p < 0.05$, $n = 6$) и статистически значимое увеличение модуля упругости ($p < 0.05$, $n = 6$), который характеризует внутреннюю жесткость конструкции, с 7.9 ± 1.5 кПа до 10.2 ± 2.1 кПа. В то же время не было выявлено статистически значимых различий при применении ацетилхолина по сравнению с контрольными измерениями (рис. 2, *C*, *D*).

Таким образом, в ходе работы были получены и охарактеризованы тканеинженерные конструкции из гладкомышечных клеток. Были рассчитаны растяжимость и модуль упругости искусственных конструкций в контроле и при фармакологических воздействиях. В дальнейшем такая физиологичная «organ-on-a-chip» модель должна обеспечить проверку возможных механизмов развития заболеваний, таких как атеросклероз и аневризма аорты, а также может быть использована для высокопроизводительного скрининга потенциальных терапевтических средств.

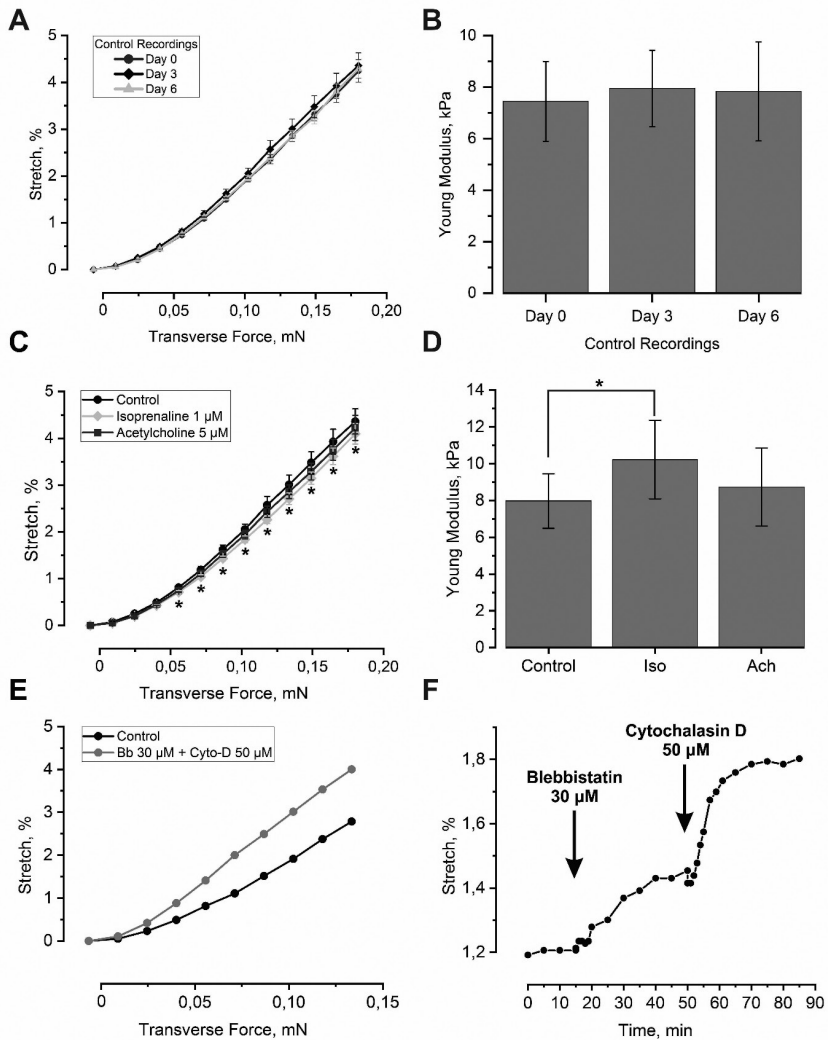


Рис. 2. Пассивные механоэластические свойства тканеинженерных конструкций в контроле и при фармакологических воздействиях. Данные представлены в виде $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n = 6$, * $p < 0.05$

Литература

1. Figallo E. [и др.]. Micro-bioreactor array for controlling cellular microenvironments // *Lab on a Chip*. 2007.
2. Fijnvandraat A. C. [и др.]. Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube // *Cardiovascular Research*. 2003.
3. Griffith L. G., Swartz M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006.
4. Grosberg A. [и др.]. Ensembles of engineered cardiac tissues for physiological and pharmacological study: Heart on a chip // *Lab on a Chip*. 2011.
5. Hwang H. S. [и др.]. Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2015.
6. Kovács M. [и др.]. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. № 34 (279). С. 35557–35563.
7. Schliwa M. Action of Cytochalasin D on Cytoskeletal Networks High-voltage Electron Microscopy Cytochalasin D Applied to Intact Cells // *Journal of Cell Biology*. 1982. № 1 (92). С. 79–91.
8. Sidorov V. Y. [и др.]. I-Wire Heart-on-a-Chip I: Three-dimensional cardiac tissue constructs for physiology and pharmacology // *Acta Biomaterialia*. 2017.
9. Synnergren J. [и др.]. Global transcriptional profiling reveals similarities and differences between human stem cell-derived cardiomyocyte clusters and heart tissue. // *Physiological genomics*. 2012.
10. Truskey G. A. Advancing cardiovascular tissue engineering // *F1000Research*. 2016.

**ПОВЫШЕНИЕ КОРРОЗИОННОЙ СТОЙКОСТИ СТАЛИ 12Х18Н10Т,
ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ ВНЕВАКУУМНОЙ
ЭЛЕКТРОННО-ЛУЧЕВОЙ НАПЛАВКИ**

THE INCREASE IN THE CORROSION RESISTANCE OF 12Х18Н10Т
STEEL, OBTAINED BY THE METHOD OF ELECTRON
VACUUM ELECTRONIC RADIATION

Е. И. Ткаченко

*Новосибирский государственный технический университет,
г. Новосибирск, Россия*

E. I. Tkachenko

Novosibirsk State Technical University, Novosibirsk, Russia

E-mail: liza1605.98@gmail.com

Аннотация

В работе сравнивалась коррозионная стойкость нержавеющей стали после электронно-лучевой наплавки со стойкостью технической стали. Обнаружено, что скорость коррозии двух материалов практически одинакова, а её значения находятся в пределах от 0,227 до 0,296 мм/год. Однако материал, полученный методом электронно-лучевой наплавки, обладает повышенным сопротивлением питтинговой коррозии.

Abstract

The corrosion resistance of stainless steel was compared to electron-beam surfacing with the resistance of technical steel. It was found that the rate of corrosion of two materials is almost the same, and it ranges from 0.227 to 0.296 mm per year. But the material obtained by electron-beam surfacing has an increased resistance to pitting corrosion.

На сегодняшний день применение биоматериалов стало жизненно необходимым вследствие их особенного влияния на качество и продолжительность жизни человека. Для изготовления обширного перечня медицинских инструментов и оборудования незаменимым материалом является сталь: благодаря своим механическим свойствам она выдерживает удары, не царапается, не вступает в химические реакции с тканями организма и межтканевыми жидкостями. Твёрдость и прочность позволяет инструменту долго не тупиться, не гнуться и не ломаться. Благодаря высокой плотности —

7,8 г/см³, — в структуре стали отсутствуют микропоры, которые могут являться причиной скопления пыли, грязи, а также болезнетворных организмов [1]. Устойчивость стали к высоким и низким температурам позволяет различными способами стерилизовать изделия.

Остатки химических реагентов на инструменте часто служат причиной образования точечной коррозии. Медицинские инструменты должны не просто выполнять свою прямую функцию: разделять, отделять или удерживать ткани организма, но также и не наносить дополнительных травм и повреждений.

Материалы из нержавеющей стали устойчивы к широкому диапазону коррозионных агентов из-за высокого содержания хрома [2]: на поверхности материала образуется инертная плёнка, которая защищает изделие от неблагоприятных воздействий. Титан, входящий в состав данной стали, уменьшает склонность к межкристаллитной коррозии.

Любые хирургические, стоматологические инструменты, оборудование, посуду, изготовленные из хромоникелевой стали, можно подвергать воздействию кислотно-щелочных сред. Однако материал не используют для внедрения в человеческий организм в качестве имплантатов, поскольку такие ионы, как Ni^{2+} и Cr^{3+} , входящие в состав стали, вызывают аллергические и токсические реакции в организме.

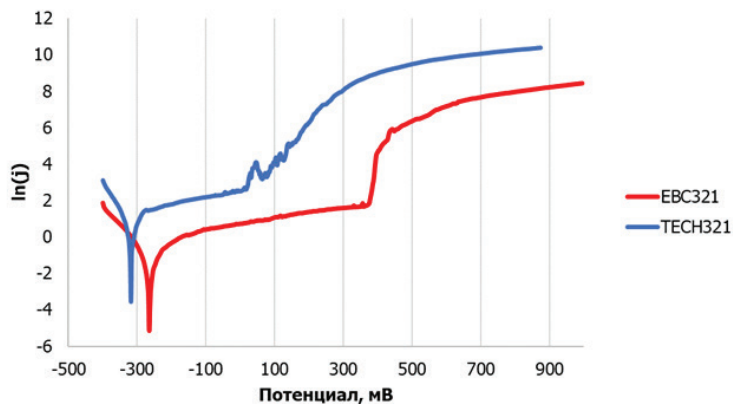
Целью работы являлось исследование коррозионной стойкости материала, полученного методом вневакуумной электронно-лучевой наплавки, схожего по химическому составу с нержавеющей сталью 12X18H10T.

Для исследования использовался материал, наплавленный методом вневакуумной электронно-лучевой наплавки с применением порошков чистых элементов (ЕВС321). В качестве образца сравнения использовалась заводская нержавеющая сталь марки 12X18H10T (ТЕСН321).

Коррозионная стойкость оценивалась с использованием потенциостата-гальваностата «Elins P30-S». Испытания проводились в потенциодинамическом режиме со скоростью развёртки 2 мВ/с. В качестве биологической среды был выбран раствор Рингера-Локка [3].

Было обнаружено, что образец ЕВС321 более стоек к окислению, по сравнению с ТЕСН321. Согласно результатам проведённых расчётов (см. таблицу), скорости окисления (CR) ТЕСН321 и ЕВС321 практически не различаются и находятся в пределах 0,227–0,296 мм/год. Однако, как следует из рисунка, потенциалы пробоя пассивирующей плёнки ($E_{\text{breakdown}}$), характеризующие сопротивление материала питтинговой коррозии, заметно различаются. В случае ТЕСН321 процесс питтингообразования происходит плавно, а в случае ЕВС321 — скачкообразно. Вероятно, данное явление связано неравномерностью химического состава материала, полученного в результате электронно-лучевой наплавки.

Таким образом, получение никельхромовой стали методом электронно-лучевой наплавки предотвращает материал от коррозионных трещин, развивающихся благодаря зародышам питтингов. Вследствие этого при дезинфекции и стерилизации инструменты из данного материала не потеряют своих свойств и не придут в негодность.



Потенциодинамические кривые нержавеющей стали 12Х18Н10Т, полученные в растворе Рингера-Локка

Поляризационное сопротивление, плотность тока коррозии, а также скорость коррозии исследуемых в работе материалов

	TECH321	EBC321
R_p , мВ·см ² /μА	714,810	697,270
j_{corr} , μА/см ²	0,021–0,026	0,020–0,025
CR, мм/год	0,240–0,296	0,227–0,286

Литература

1. Новиков В. Т. Оборудование и основы проектирования систем охраны окружающей среды: Учебн. пос. // Том. политехн. ун-т. Томск, 2006. С. 7–10.
2. Комарова Е. Г. Закономерности формирования структуры и свойств микродуговых покрытий на основе замещённых гидроксипапатитов на сплавах титана и ниобия // Томск, 2017. С. 26.
3. Tas A. C. The use of physiological solutions or media in calcium phosphate synthesis and processing // Acta biomaterialia. — 2014. — Т. 10. — №. 5. — С. 1771–1792.

**ПРИМЕНЕНИЕ КАСКАДНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ
В ПРИГОТОВЛЕНИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ,
ИСПОЛЪЗУЕМОЙ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
ВАКЦИННОГО ШТАММА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА ***

APPLICATION OF CASCADE FILTRATION IN PREPARATION
OF THE NUTRIENT MEDIUM USED IN SUBMERGED CULTIVATION
OF TULAREMIA MICROBE VACCINE STRAIN

К. И. Холматов, М. В. Антонычева, О. А. Волох, Н. И. Вахрушина,
А. Д. Белоусов, С. В. Астафьева, Н. Г. Авдеева

*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт
«МИКРОБ», г. Саратов, Россия*

K. I. Kholmatov, M. V. Antonycheva, O. A. Volokh, N. I. Vakhrushina,
A. D. Belousov, S. V. Astaf'eva, N. G. Avdeeva

*FGHI Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe",
Saratov, Russian Federation*

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Аннотация

В работе представлены результаты внедрения в технологию приготовления питательной среды, для ее очистки, метода каскадной фильтрации, который не оказывает негативного влияния на качество и эффективность глубинного культивирования производственного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ.

Abstract

The paper presents the results of cascade filtration introduction into the technology of nutrient medium preparation used for its purification, which does not have a negative impact on the quality and effectiveness of submerged cultivation of the production strain, *Francisella tularensis* 15 NIEG.

© К. И. Холматов, М. В. Антонычева, О. А. Волох, Н. И. Вахрушина, А. Д. Белоусов, С. В. Астафьева, Н. Г. Авдеева, 2018.

* Работа выполнена по теме НИР 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (2017–2019 гг.).

Штаммом-продуцентом живой туляремийной вакцины является штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Для накопления биомассы туляремийного микроба в РосНИПЧИ «Микроб» используют жидкую питательную среду на основе концентрированного панкреатического гидролизата фибрина (Пат. 2518282 РФ. МПК C12N1/20).

Питательную среду готовят в реакторе: под вакуумом закачивают воду очищенную методом дистилляции, с расчётом на её выкипание, добавляют сухой ферментативный гидролизат фибрина в количестве, обеспечивающем содержание в среде не менее 0,32 % аминного азота. Вносят глюкозу до концентрации 1 %. Всё перемешивают и устанавливают в среде pH (7,2±0,2) при помощи 20 % раствора натрия гидроокиси. Традиционно бульон фильтруют при температуре (75±5) °C через фильтр Сальникова под давлением (2,5±0,5) МПа. Жидкую среду из ферментативного гидролизата фибрина стерилизуют водяным насыщенным паром при (110±2) °C в течение 30 мин при давлении (0,05±0,02) Мпа. Перед внесением инокулята посевной культуры в стерильную среду добавляют стерильный раствор пантотената кальция в концентрации 0,005 % (0,05 г/л).

Нами усовершенствована технология приготовления питательной среды. Для очистки среды от крупных не гидролизованных комплекс-протеидов крови лошади (гемоглобин, гликопротеиды, липопротеиды, иммуноглобулины и т. п.) внедрен метод каскадной фильтрации через последовательно соединенные патронный глубинный фильтр ЭПВг.П и патронный мембранный фильтр ЭПМ. К. Фильтроэлемент ЭПМ.К в соответствии с «Правилами организации производства и контроля качества лекарственных средств», утв. приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. N 916, проверяют на целостность методом «точка пузырька» на приборе Palltronic Flowstar IV.

Влияние метода каскадной фильтрации оценено по физико-химическим показателям качества питательной среды в соответствии с МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Физико-химические показатели качества питательной среды до и после применения внедренной технологии представлены в таблице.

Накопление биомассы *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ осуществляли методом глубинного культивирования в биореакторе с автоматическим поддержанием параметров культивирования: аэрация 0,5–0,7 л воздуха на 1 л питательной среды, скорость перемешивания 500 об/мин в течение (20±2) ч при температуре 37 °C.

**Физико-химические показатели качества
питательной среды (ПС)**

№	Показатель	ПС до применения каскадной фильтрации	ПС после применения каскадной фильтрации (n = 7)*
1	pH среды	7,2	7,2 ± 0,04
2	Прозрачность среды (по оптической плотности, длина волны, КФК-2 λ=540; 10 мм)	0,38	0,25±0,008
3	Общий N, %	0,592	0,592±0,009
4	Аминный N, %	0,32	0,32±0,004
5	Глюкоза, %	1	1

Примечание. * — статистическая значимость по Стьюденту с 90%-й достоверностью.

В результате глубинного культивирования нативная культура *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: pH (7,0±0,1), концентрация микробных клеток (36,6±0,83) млрд.м.к./мл среды (по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО 42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития России, эквивалентной концентрации 5 млрд.м.кл./мл).

Туляремиальный микроб имел морфологические (форма и размер клеток) и культуральные (форма колонии) свойства, характерные для возбудителя туляремии: мелкие кокковидные палочки, неподвижные, грамотрицательные. Титр агглютинации туляремиальной сывороткой составил 1:3200. Туляремиальный микроб обладал следующими характеристиками: коэффициент жизнеспособности 62±0,5 %, низкая степень диссоциации (97±1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии негативного влияния внедренного метода фильтрации жидкой среды на её качество и на результат глубинного культивирования производственного штамма туляремиального микроба, что подтверждает эффективность метода.

**СТРАТЕГИЯ УСИЛЕНИЯ БИОСИНТЕЗА
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ЭКДИСТЕРОИДОВ
В КУЛЬТУРЕ *HAIRY ROOTS* ВИДОВ РОДА *SILENE L.****

ENHANCED PRODUCTION OF PHARMACEUTICALLY IMPORTANT
ECDYSTEROIDS FROM *HAIRY ROOT* CULTURES OF SPECIES
OF THE GENUS *SILENE L.*

А. А. Эрст¹, Л. Н. Зибарева², Е. С. Филоненко²

¹ ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад
Сибирского отделения Российской академии наук

² Национальный исследовательский Томский государственный
университет

A.A. Erst¹, L.N. Zibareva², E.S. Filonenko²

¹ CSBG SB RAS, Russia

² NR TSU, Russia

E-mail: annaerst@yandex.ru

Аннотация

В данном исследовании разработана эффективная стратегия получения быстро-растущих линий *hairy roots* для получения биологически активных экдистероидов. Представители рода *Silene* являются важными источниками фитоэкдистероидов с огромной перспективой медицинского применения. Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации нами получена культура *hairy roots* экдистероидсодержащих видов *Silene linicola*, *S. frivaldszkyana* и *S. roemerii*. ВЭЖХ анализ исследуемых образцов показал, что в заданных условиях эксперимента синтезируются интегристерон А, 2-дезоксидеко-20-гидроксиэкдизон, 20-гидроксиэкдизон, 2-дезоксидеко-20-гидроксиэкдизон, полиподин В и редкий экдистероид — туркестерон. Показано, что внесение элиситоров и предшественников биосинтеза экдистероидов, таких как метилжасмонат в концентрации 100 мкМ и ацетат натрия — 1,8 мМ, стимулируют биосинтез

© А. А. Эрст, Л. Н. Зибарева, Е. С. Филоненко, 2018.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН № 0312-2016-0001 по проекту «Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами»; а также в рамках гранта РФФИ р_а проект № 16-44-7000634 «Исследование лекарственных растений Томской области, адаптивных возможностей интродукторов с целью создания сырьевой базы видов, перспективных для лечения социально-значимых заболеваний».

экидстероидов и могут быть рекомендованы в качестве регуляторов биосинтеза этой группы веществ в культурах *hairy roots*.

Abstract

These studies report the development of an efficient technique for cultivation of fast-growing hairy root culture systems for production of bioactive ecdysteroids. Representatives of the genus *Silene* is an important source of pharmaceutically important ecdysteroids with immense health care applications. By the method of *Agrobacterium*-mediated transformation, we have obtained hairy root culture of the ecdysteroid-containing species of *Silene linicola*, *S. frivaldszkyana* and *S. roemerii*. HPLC analysis of the samples under study showed that integristerone A, 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, 20-hydroxyecdysone, 2-deoxy ecdysone, polypodin B and rare ecdysteroid, turkesterone were synthesized under the specified experimental conditions. Methyl jasmonate 100 μ M and sodium acetate 1,8 mM was found to have a stimulating effect on ecdysteroid biosynthesis in this culture and can be recommended as a promising stimulator of biosynthesis of this group of secondary metabolites in *hairy roots*.

Экидстероиды представляют самый распространенный и многочисленный класс стероидных соединений в биосфере; они участвуют в жизнедеятельности практически всех классов организмов, выполняя множественные функции. Выделены и установлены структуры более 400 экидстероидов, в том числе и из растений семейства Caryophyllaceae Juss, которые занесены в единую базу данных <http://ecdybase.org/>. Одним из наиболее богатых по количеству экидстероидсодержащих видов является род *Silene* L. [1, 2]. Состав и содержание экидстероидов представителей этого рода является видоспецифичными и в значительной степени зависят от места произрастания, стадии развития и условий выращивания [3, 4]. По этой причине использование культуры клеток и органов является важным альтернативным источником получения суммы и отдельных экидстероидов, позволяющим избежать проблем связанных с непостоянным уровнем биосинтеза вторичных метаболитов, а также представляет собой модельную систему для изучения регуляции их биосинтеза.

Цель данной работы — получить быстрорастущие культуры *hairy roots* видов рода *Silene* и оценить влияние элиситоров и предшественников биосинтеза на содержание экидстероидов в данных культурах.

В результате данной работы получены культуры *hairy roots* экидстероидсодержащих видов *Silene frivaldszkyana*, *S. linicola*, *S. roemerii*. Показано, что в процессе культивирования в выбранных условиях происходит активный синтез как полярных, так и неполярных экидстероидов. В экстрактах *hairy roots* идентифицированы характерные экидстероиды для видов рода *Silene*: интегристерон А, 20-гидроксизекдизон (20E), 2-дезоксизекдизон (20D), 2-дезоксизекдизон (20D).

зон, 2-дезоксизидизон, полиподин В и редкий экистероид — туркестерон. Отобраны линии *hairy roots* характеризующиеся высокими темпами роста (индекс роста=25) и повышенным содержанием 20Е (0,18 %) и/или более разнообразным составом экистероидов (21 компонент) по сравнению с растениями-донорами.

Нами показано, что внесение элиситоров и предшественников биосинтеза экистероидов, таких как метилжасмонат в концентрации 100 мкМ и ацетат натрия — 150 мг/л, стимулируют биосинтез экистероидов (качественный и количественный состав) и могут быть рекомендованы в качестве регуляторов биосинтеза экистероидов в культурах *hairy roots* представителей р. *Silene*. Уровень биосинтеза экистероидов линий *hairy roots* одно и того же вида *S. linicola*, полученные при трансформации различными штаммами агробактерий различается в 9 раз. В процессе работы отобрана линия *hairy roots* с наибольшим уровнем биосинтеза 20Е — *S. linicola* К-1601, превышающим уровень данного экистероида в корнях растения-донора в 1,8 раза.

Таким образом, отбирая линии *hairy roots* и используя различные элиситоры либо предшественники биосинтеза терпеноидов можно варьировать набор экистероидов в культурах *hairy roots* представителей р. *Silene* и целенаправленно осуществлять их биосинтез. Проведенные нами исследования являются основой создания новых производственных биотехнологий получения уникальных биологически активных веществ — фитоэкистероидов и лекарственных препаратов на их основе.

Литература

1. Zibareva L., Volodin V., Saatov Z., Savchenko T., Whiting P., Lafont R., Dinan L. Distribution of phytoecdysteroids in the Caryophyllaceae // *Phytochemistry*. 2004. Vol. 64. P. 499–517.
2. Зибарева Л. Н., Волкова О. В., Морозов С. В., Черняк Е. И. Фитоэкистероиды корней *Silene frivaldszkyana* Hampe // *Химия растительного сырья*. 2017. № 1. С. 71–75.
3. Зибарева Л. Н., Еремина В. И. Динамика содержания экистероидов в видах *Silene* // *Раст. ресурсы*. 1996. Т. 32, вып. 1–2. С. 106–110.
4. Зибарева Л. Н., Еремина В. И., Иванова Н. А. Новые экистероидоносные виды рода *Silene* L. и динамика содержания в них экистерона // *Раст. ресурсы*. 1997. Т. 33, вып. 3. С. 73–76.

ПРОДУКТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ БИОИНЖЕНЕРИИ

PRODUCTS PRODUCED BY THE METHODS OF BIOENGINEERING

Д. Е. Юрк, В. Н. Михеев, С. П. Романенко, М. А. Лобкис

*ФБУН «Новосибирский научно-исследовательский
институт гигиены» Роспотребнадзора*

D. E. Yurk, V. N. Mikheev, S. P. Romanenko, M. A. Lobkis

FBUN «Novosibirsk research Institute of hygiene» of Rosпотребнадzor

Аннотация

В докладе основное внимание уделяется вопросу использования методов биоинженерии в производстве продуктов питания. Приводятся взгляды сторонников и противников генной инженерии и информация о возможных рисках использования методов биоинженерии.

Abstract

The report focuses on the issue of the use of bioengineering techniques in food production. Views of supporters and opponents of genetic engineering and information on possible risks of using bioengineering methods is provided is given.

Биотехнология представляет собой новейшую отрасль науки и производства. Она основана на использовании объектов и биопроцессов для создания высокопродуктивных сортов растений, пород животных и даже штаммов микроорганизмов. Рассматриваемая отрасль науки реализует на практике фундаментальные биологические знания для производства ферментов, белков, витаминов, лекарственных препаратов и ряда биологически активных веществ. Биотехнологические методы позволяют конструировать принципиально новые организмы, ранее не существовавшие в природе, получать целевые продукты для медицины и народного хозяйства с помощью микроорганизмов, вирусов, внеклеточных веществ и компонентов клетки. Биотехнология имеет глубокое прошлое, но лишь за последние несколько десятилетий получила признание и независимость, выделившись в отдельную отрасль науки и производства [1,3].

Множество исследований в области биохимии, микробиологии, генетики организмов, включая знаменательное открытие Джеймса Уотсона и Френсиса Кирка о химической структуре и пространственной организации двойной спирали молекулы ДНК в 1953 г., оказали огромный вклад в развитие биотехнологии, но новое ее направление — генетическая инженерия — появилось лишь к 1972 г., когда в лаборатории Поля Берга впервые была синтезирована рекомбинантная молекула ДНК. Клеточная же инженерия, возникла еще в 50-х годах прошлого столетия, благодаря исследованиям П. Ф. Уайта (США) и Р. Готре (Франция). Методы её направлены на конструирование клеток нового типа, которые могут быть использованы для создания жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток или для объединения различных видов клеток, с образованием новой, несущей генетический материал исходных клеток.

Генетическая и клеточная инженерия на данный момент являются основными направлениями современной биотехнологии в нашей стране и за рубежом. Методы генной инженерии направлены на конструирование новых, ранее не существовавших в природе генов и благодаря этому получать продукты, организмы с требуемыми качествами. Нарботки в этой области используются для создания и использования генетически модифицированных растений, животных и микроорганизмов для интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

На сегодня наиболее актуальными направлениями в рассматриваемой области являются биотехнология пищевых продуктов, препаратов для сельского хозяйства, препаратов и продуктов для промышленного и бытового использования, лекарственных препаратов, средств диагностики и реактивов. Первые генетически модифицированные продукты были запущены в производство в конце 80-х годов бывшей военной компанией Монсанто (Америка).

Несмотря на то, что открытие генетически модифицированных организмов (ГМО) является прорывом для человечества, проблема опасности продуктов, созданных с применением этих методов, не перестает тревожить умы людей. Нет однозначного ответа на вопрос безопасности ГМО и влияния их на организм человека ввиду малой изученности данной проблемы и новизны технологии. Противники генной инженерии приводят данные исследований, подтверждающих негативное влияние ГМО на организм человека. В случае прямого воздействия трансгенных белков наблюдаются подавление иммунитета, аллергии и расстройства метаболизма. Также наблюдается аккумуляция гербицидов в организме человека, нарушение усвояемости важных веществ и микроэлементов, а также появление толерантности болезнетворной микрофлоры организма человека к антибиотикам,

снижение поступления в организм важных элементов. Ряд исследователей говорят об отдаленных канцерогенном и мутагенном эффектах.

Исследования И. В. Ермаковой, сотрудника Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН заключались в экспериментах на трех группах лабораторных крыс: контрольной, в корм которой ничего не добавлялось, группой; к корму которой добавлялась мука из ГМ-сои, произведенная компанией Монсанто; к корму которой добавлялась мука из традиционной сои. Соевая мука во всех случаях смешивалась с водой. В первой серии экспериментов самки кормились, начиная за две недели до зачатия, и вплоть до выкармливания крысят. Выжившие крысята не умирали и продолжали питаться ГМ-кормом вместе с самками. Благодаря защите эмбриона материнским организмом критический негативный эффект не наблюдался, но 40 % крысят значительно уступают по размеру и весу контрольной группе.

В другой серии экспериментов самцы крыс кормились семенами ГМ-сои, устойчивой к Раундапу (Аргентина) и традиционной сои (Волгоград). При извлечении семенников на срезе морфологически было обнаружено нарушение кровоотока и патологический митоз клеток. После одного месяца эксперимента у группы, употреблявшей ГМ-корм, были обнаружены диффузные дистрофические изменения, перичеселлюлярный отек, резкое набухание гепатоцитов и их вакуолизация [4].

Д. Е. Шуберт изучал влияние корма с добавлением плазмид с геном флуоресцентного зеленого белка на беременных мышей. Спустя 3–8 часов после кормления проводилась локализация местоположения гена. Было обнаружено, что ген флуоресцентного зеленого белка встраивается также в клетки разных органов плода, таких как мозг, кожа, печень, селезенка, почки, и сохраняется у новорожденных мышей.

Исследования долгосрочного влияния питания ГМО проводились Сералини Г. Е. в 2012 г. на крысах. По результатам работы было обнаружено, что группа крыс, питавшаяся ГМ-кукурузой, более подвержена развитию онкологических заболеваний, нежели контрольная [5].

Сторонники генной инженерии отрицают негативное влияние ГМО на организм человека, в том числе многочисленные аналогичные эксперименты на лабораторных крысах, хронически употреблявших трансгенную сою, устойчивую к глифосфату, опровергают результаты противников генетически модифицированных продуктов [6–7].

Существует три категории рисков, связанных с применением генной инженерии к продуктам питания — медицинские, социально-экономические и экологические. Медицинские риски обусловлены повышенной аллергеноопасностью, токсичностью и опасностью ГМО для здоровья. Социальные и экономические угрозы попадают под определение «продовольственной

безопасности», то есть способности людей обеспечить свои продовольственные потребности в здоровых, разнообразных и доступных по цене продуктах питания. Также большой проблемой является бесплодность растений, идущих на продажу, так как это закрывает возможность последующего сбора семян [2].

Несмотря на неоспоримые плюсы генной инженерии, результаты отдельных исследований, систематически появляющиеся в научных статьях и средствах массовой информации, вызывают серьезные опасения и настороженность при использовании ГМ-продуктов. Для решения проблемы ГМО требуется систематизация наработок ученых разных стран и проведение целого ряда исследований, в том числе для оценки отдаленных последствий использования генетически модифицированных продуктов. В частности, необходимо более подробно изучить и усовершенствовать способы встраивания генов для обеспечения безопасности человека и окружающей среды.

Литература

1. Антипова Л. В. Прикладная биотехнология: учеб. пособие / Л. В. Антипова. — СПб.: ГИОРД, 2003. — С. 288 с.
2. Чилимбаева Г. А., Маркабаева А. Генная инженерия — веление времени // Молодой ученый. — 2014. — №8.1. — С. 31–33.
3. Касымбаева Т., Мухамбетжанов К. Общая биология / Мектеп, 2010.
4. Ermakova I. Influence of genetically modified soya on the birth-weight and survival of rat pups/ I. Ermakova // Proceedings «Epigenetics, Transgenic Plants and Risk Assessment». — 2006. — С. 41–48.
5. Séralini G. E. Food Chem. Toxicol. Food Chem. Toxicol. / E. Clair, R. Mesnage, S. Gress, N. Defarge, M. Malatesta, D. Hennequin, J.S de Vendômois // «Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize». — 2012.
6. Key S. Genetically modified plants and human health / S. Key J. K. Ma, P. M. Drake // J R Soc Med., 2008. — Т. 101, № 6. — С. 290–298.
7. Brake D. G. «A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development» / Brake D. G., Evenson D. P. — South Dakota State University, 2004.

РАЗДЕЛ 2

ВИРУСОЛОГИЯ**МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ
СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ЛИТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА
PM135, ПОРАЖАЮЩЕГО *PROTEUS MIRABILIS******MASS-SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF STRUCTURAL
PROTEINS OF *PROTEUS MIRABILIS*
LYTIC BACTERIOPHAGE PM135**

И. К. Байков¹, Е. А. Зеленцова², В. В. Морозова¹, Т. А. Ушакова¹,
О. В. Боковая¹, М. В. Фофанов¹, Н. В. Тикунова¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия*

² *Институт «Международный томографический центр»
Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия*

I. K. Baykov¹, E. A. Zelentsova², V. V. Morozova¹, T. A. Ushakova¹,
O. V. Bokovaya¹, M. V. Fofanov¹, N. V. Tikunova¹

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

² *International Tomography Center SB RAS, Novosibirsk, Russia*

© И. К. Байков, Е. А. Зеленцова, В. В. Морозова, Т. А. Ушакова, О. В. Боковая,
М. В. Фофанов, Н. В. Тикунова, 2018.

* Работа была выполнена при поддержке Фонда РФФИ, проект № 18-34-00636.
Образец бактериофага был наработан из коллекции, финансируемой по проекту ГЗ
№ 0309-2016-0002.

Аннотация

В исследовании идентифицирован ряд структурных белков литического бактериофага PM135, поражающего бактерии *Proteus mirabilis*. Этот бактериофаг относится к семейству *Siphoviridae* и имеет низкий процент сходства генома с геномами известных бактериофагов. Методом масс-спектрометрии были идентифицированы зрелый капсидный белок, белок хвостовых нитей, белок концов хвостовых нитей, порталный белок, а также короткий белок, не имеющий сходства с известными белками и содержащий необычный мотив, состоящий из остатков пролина и глутаминовой кислоты.

Abstract

A number of structural proteins of the lytic bacteriophage PM135, which affects the *Proteus mirabilis* bacterium, are identified in this study. This bacteriophage belongs to the *Siphoviridae* family and has a low percentage of genome similarity with the genomes of known bacteriophages. The mature capsid protein, the tail fiber protein, straight tail fibers protein, portal protein, pore-forming tail tip protein were identified by mass spectrometry as well as a short protein that does not have significant similarity with the known proteins and which contains an unusual motif consisting of proline and glutamic acid residues.

Введение

Лечение инфекционных заболеваний с помощью бактериофагов в настоящее время быстро набирает популярность, что связано с повышением доли патогенных микроорганизмов, обладающих широкой лекарственной устойчивостью. Сотрудниками Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН ранее обнаружен и депонирован в «Коллекцию экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН» литический бактериофаг PM135, способных подавлять рост бактерий *P. mirabilis* (данные готовятся к публикации). В результате морфологического анализа и секвенирования генома этого бактериофага (GenBank: MG030347.1) было установлено, что он относится к семейству *Siphoviridae*, род T5virus, однако имеет значительное число открытых рамок трансляции (ОРТ), не имеющих гомологии с известными последовательностями. Вместе с тем, геномы бактериофагов, предполагаемых для терапевтического использования, необходимо аннотировать достоверно и полностью. В этом случае можно исключить наличие генов, кодирующих токсины, интегразы, способствующие интеграции фага в геном клетки-хозяина, и тем самым гарантировать биобезопасность бактериофага при его терапевтическом использовании. В связи с этим в данной работе был масс-спектрометрически проанализирован ряд структурных белков бактериофага PM135, а сопоставление с информацией, полученной на основе генома этого бактериофага, позволило установить функции большинства этих белков.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы был наработан препарат бактериофага PM135 с использованием штамма *P. mirabilis* «КМТК 73». Для удаления клеточных белков бактериофаг был очищен с методом центрифугирования в градиенте хлористого цезия, после чего препарат был диализован против фосфатно-солевого буферного раствора. Титр очищенного бактериофага составил около $2.5 \cdot 10^{11}$ б.о.е./мл.

Препарат бактериофага PM135 был разделён в результате денатурирующего гель-электрофореза и окрашен серебром либо красителем “Coomassie brilliant blue G-250” (рис. 1). Было обнаружено, что часть белков образует ковалентные комплексы, в которых отдельные молекулы белка соединены дисульфидными связями. Обработка образца бактериофага дитиотреитолом приводила к исчезновению полос, соответствующих таким комплексам (рис. 1А, дорожка 2).

Белковые полосы с геля, окрашенного красителем Coomassie, были вырезаны, после чего был произведён триптический гидролиз белков в геле. Полученные образцы были исследованы MALDI масс-спектрометрией в по-

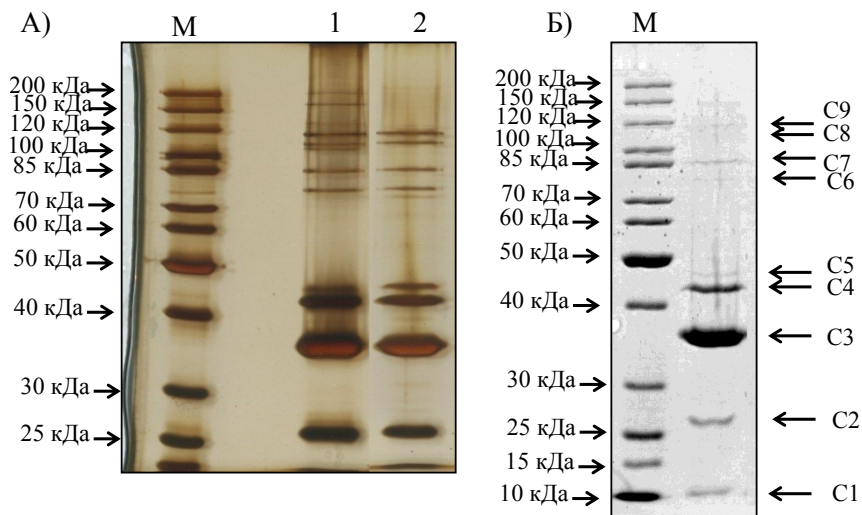


Рис. 1. Электрофореграмма препарата бактериофага PM135 в 10% денатурирующем полиакриламидном геле. А) 10 мкл препарата на дорожку, окраска серебром, Б) 50 мкл препарата на дорожку, окраска “Coomassie brilliant blue G-250”. М — маркер молекулярных масс (Thermo scientific #26614)

ложительном режиме. В результате все проанализированные образцы кроме образца С8 были идентифицированы как белки бактериофага PM135 (см. таблицу).

Идентифицированные структурные белки бактериофага PM135

Образец	Комментарий
C1	Hypothetical protein ATW69889.1
C1	Putative L-shaped tail fiber assembly protein
C2	Hypothetical protein ATW69889.1 в комплексе с другим белком
C3	Capsid protein
C4	Ig-like domain protein
C5	Portal protein
C6	Straight tail fibers protein
C7	Tail fiber
C9	Pore-forming tail tip protein

Стоит отметить, что ОПТ, кодирующая капсидный белок, соответствует белку с молекулярной массой около 50 кДа. В то же время, подвижность белка при гель-электрофорезе, а также идентифицированные продукты триптического гидролиза свидетельствуют о том, что в вирионе этот белок присутствует в зрелом виде, не имеющем N-концевой части и характеризующимся молекулярной массой около 37 кДа. Процессинг капсидного белка описан ранее для родственного бактериофага T5, поражающего *E. coli* (A. Huet et al., 2010).

Помимо белков с явной функциональной ролью, в образцах С1 и С2 были обнаружены пептиды, соответствующие небольшой ОПТ ATW69889.1, не имеющей значительного сходства с каким-либо из известных белков (рис. 2). Представляет интерес мотив, состоящий из чередующихся остатков пролина и глутаминовой кислоты. Учитывая высокую представленность данного белка в образце бактериофага PM135, а также небольшой размер самого белка, мы предполагаем, что этот белок является декорирующим белком, аналогом белка pb10 бактериофага T5. По-видимому, множество копий этого белка встраивается в капсид бактериофага PM135 при его созревании и выполняет маскирующую роль. Если это предположение верно, то в случае возникновения иммунного ответа у пациента при необходимости продолжительного лечения бактериофагом PM135, незначительное изменение аминокислотной последовательности этого декорирующего белка позволит избежать нежелательных реакций организма.

MYKEIDKELISKLKEVFPAGLPDSSSLFFATEANPIKSYQELRRALGVTTAVGNRKCYK
ALMALLDVEDPV**EPEPEPEPEPEPEPEPEPE**VKVTCLKIIGNDTVVEGEEYSFDVRADGGA
ANNTVVKVNGVVNNKYKVVAELPTITIEATASNADKVTKVVTVTAKPQPEET

Рис. 2. Последовательность аминокислотных остатков белка ATW69889.1 бактериофага PM135 P. mirabilis. Выделен участок чередующихся остатков пролина и глутаминовой кислоты

Таким образом, масс-спектрометрически был идентифицирован ряд структурных белков бактериофага PM135, было установлено, что белок ATW69889.1 является высококопийным структурным белком и, по-видимому, выполняет роль декорирующего белка.

Литература

1. Huet A, Conway JF, Letellier L, Boulanger P. In vitro assembly of the T=13 procapsid of bacteriophage T5 with its scaffolding domain. J Virol. 2010 Sep; 84(18):9350–9358.

**АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА
CH14D5 С ТРЕТЬИМ ДОМЕНОМ ГЛИКОПРОТЕИНА E
РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПОВ ВИРУСА
КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ***

ANALYSIS OF INTERACTIONS BETWEEN CHIMERIC ANTIBODY
CH14D5 AND D3 DOMAIN OF E GLYCOPROTEIN DERIVED FROM
VARIOUS SUBTYPES OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS

И. К. Байков, А. Л. Матвеев, С. Е. Ткачёв,
Л. А. Емельянова, Г. Б. Каверина, Н. В. Тикунова

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия*

I. K. Baykov, A. L. Matveev, S. E. Tkachev,
L. A. Emelianova, G. B. Kaverina, N. V. Tikunova

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

Аннотация

Химерное антитело ch14D5 ранее успешно прошло доклинические испытания и в настоящий момент рассматривается в качестве основы для создания лекарственного средства для профилактики и терапии клещевого энцефалита. В данной работе были сконструированы домены D3 гликопротеина E вируса клещевого энцефалита сибирского, европейского и дальневосточного подтипов. Методами вестерн-блот анализа и поверхностного плазмонного резонанса было показано, что химерное антитело ch14D5 обладает наибольшим сродством к домену D3 вируса клещевого энцефалита линии Софьин-Ру, принадлежащей к дальневосточному подтипу, в то время как сродство к белкам, полученным на основе вирусов сибирского и европейского подтипов заметно снижено.

© И. К. Байков, А. Л. Матвеев, С. Е. Ткачёв, Л. А. Емельянова, Г. Б. Каверина, Н. В. Тикунова, 2018.

*Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках гранта Президента РФ, проект № МК-6575.2018.4. Химерное антитело ch14D5 было наработано и очищено при поддержке проекта РНФ 16-14-00083. Домен D3 вируса клещевого энцефалита штамма Sofjin-RU был получен при поддержке проекта РНФ 17-74-10146. Вирусная РНК и кДНК были получены в рамках проекта РФФИ № 18-44-540021.

Abstract

Previously, the chimeric antibody ch14D5 successfully passed preclinical trials. Now it is considered as the basis for the development of a therapeutic drug for prevention and therapy of tick-borne encephalitis. In this paper, D3 domains of glycoprotein E of the tick-borne encephalitis virus of the Siberian, European and Far Eastern subtypes were constructed. It was shown by Western blot analysis and surface plasmon resonance that chimeric antibody ch14D5 has the greatest affinity for the D3 domain of the Sofin-Ru strain of the tick-borne encephalitis virus. At the same time, the affinity of the antibody for D3 proteins obtained on the basis of viruses of the Siberian and European subtypes is markedly reduced.

Введение

Химерное антитело ch14D5 ранее успешно прошло доклинические испытания и в настоящий момент рассматривается в качестве основы для создания лекарственного средства для профилактики и терапии клещевого энцефалита. Такой препарат будет существенно превосходить сывороточный иммуноглобулин против вируса клещевого энцефалита по ряду параметров, главным образом по специфической активности и биобезопасности. Ранее было показано, что химерное антитело ch14D5 обладает высокими протективными свойствами *in vivo* в отношении европейского подтипа вируса клещевого энцефалита, штамм «Абсеттаров» (Baykov I et al., 2014). Кроме того, в настоящее время идут эксперименты по изучению протективной активности *in vivo* с использованием вируса клещевого энцефалита сибирского и дальневосточного подтипов. Вместе с тем, детальный механизм противовирусного действия антитела ch14D5 не исследован, равно как и эпитоп, с которым связывается антитело на поверхности вириона.

Недавно было установлено, что эпитоп расположен в домене D3 гликопротеина E (Байков И. К. и др., 2018). Последовательность этого домена консервативна для различных штаммов вируса клещевого энцефалита, однако в некоторых позициях редко встречаются аминокислотные замены. Поскольку точные аминокислотные остатки, входящие в узнаваемый антителом ch14D5 эпитоп, неизвестны, то не удаётся предсказать, будет ли это антитело эффективным в отношении всех подтипов вируса клещевого энцефалита. Чтобы оценить, будет ли антитело ch14D5 обладать протективной активностью по отношению к вирусам дальневосточного и сибирского подтипов, в данном исследовании были получены рекомбинантные домены D3 вирусов клещевого энцефалита, относящихся ко всем трем наиболее распространённым подтипам, и было исследовано взаимодействие антитела ch14D5 с этими белками методами поверхностного плазмонного резонанса и вестерн-блоттинга.

Результаты и обсуждение

На основе вирусной РНК штаммов «Заусаев» и «Абсеттаров», относящихся соответственно сибирскому и европейскому подтипам вируса клещевого энцефалита, были получены фрагменты ДНК, кодирующие домен D3 гликопротеина Е этих вирусов. Фрагменты были встроены в плазмидную ДНК рHEN2-rED3_301, использованную нами ранее для получения фрагмента D3 штамма Sofjin-Ru и содержащую лидерный пептид пектат-лиазы В, направляющий синтез белка в периплазматическое пространство *E. coli* (Байков И. К. и др, 2018). После индукции синтеза белка из клеток были выделены фракции периплазматических белков, содержащих целевые белки D3_Sof, D3_Eu и D3_Zau (рис. 1).

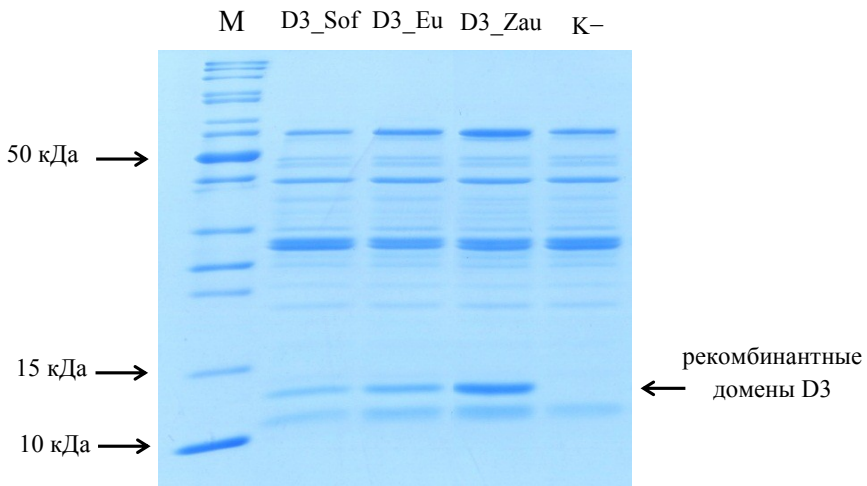


Рис. 1. Электрофореграмма в 15% полиакриламидном геле периплазматических фракций клеток, содержащих плазмиду рHEN2-rED3_301 (дорожка 2), рHEN2-D3_Eu (дорожка 3) и рHEN2-D3_Zau (дорожка 4). «К-» периплазма клеток, не содержащих плазмидной ДНК. М — маркер молекулярных масс (Thermo scientific #26614)

Далее методом вестерн-блот анализа было исследовано взаимодействие химерного антитела ch14D5 с полученными рекомбинантными белками. Количество материала для переноса белков было выбрано так, чтобы на нитроцеллюлозной мембране оказалось равное количество целевых белков. В результате было показано, что химерное антитело проявляет наибольшее сродство к варианту D3_Sof. Вариант D3_Zau окрашивался со

значительно меньшей интенсивностью, а вариант D3_Eu окрасился наиболее бледно (рис. 2).

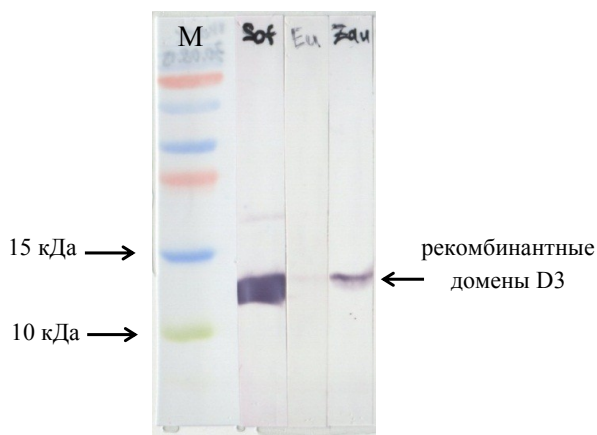


Рис. 2. Вестерн-блот анализ белков D3_Sof (полоска 2), D3_Eu (полоска 3) и D3_Zau (полоска 4) антителом ch14D5. М — маркер молекулярных масс (Thermo scientific #26619). Белковые комплексы проявлены конъюгатом Sigma #A1543

Наконец, методом поверхностного плазмонного резонанса было определено сродство химерного антитела ch14D5a к полученным рекомбинантным белкам. Значения равновесных констант диссоциации составили 1.7 ± 0.3 нМ для белка D3_Sof, 260 ± 30 нМ для белка D3_Eu и 25 ± 4 нМ для белка D3_Zau, что хорошо согласуется с качественными данными, полученными методом вестерн-блот анализа.

Таким образом, показано, что сродство химерного антитела ch14D5 к домену D3 гликопротеина Е различных подтипов вируса клещевого энцефалита существенно различается. Наименьшее сродство антитело проявляет к белку, полученному на основе штамма «Абсеттаров», и в то же время известно, что антитело ch14D5 обладает высокими протективными свойствами по отношению к штамму «Абсеттаров». Поэтому есть все основания полагать, что протективная активность этого антитела по отношению к штаммам сибирского и дальневосточного подтипов будет также высокой.

Литература

1. Baykov I. K., Matveev A. L., Stronin O. V., Ryzhikov A. B., Matveev L. E., Kasakin M. F., Richter V. A., Tikunova N. V. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus. *Vaccine*. 2014 Jun 17;32(29):3589–3594.

2. И. К. Байков, Л. А. Емельянова, Л. М. Соколова, Е. М. Карелина, А. Л. Матвеев, И. В. Бабкин, Я. А. Хлусевич, В. Ф. Подгорный, Н. В. Тикунова. Анализ доменной специфичности протективного химерного антитела ch14D5a против гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018 ; 22(4), С. 857–864.

**ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА А И В СРЕДИ
НАСЕЛЕНИЯ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2017–2018 ГГ.
НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН***

CIRCULATION OF INFLUENZA A AND B VIRUSES AMONG
THE POPULATION IN THE TERRITORY OF THE REPUBLIC
OF KAZAKHSTAN DURING THE 2017–2018 EPIDEMIC SEASONS

А. М. Баймухаметова¹, С. Б. Байсейіт¹, Н. С. Онгарбаева^{1,2},
М. Г. Шаменова¹, Т. И. Глебова¹

¹ *ТОО «Научно-производственный центр микробиологии
и вирусологии», Алматы, Республика Казахстан*

² *Казахский Национальный Университет имени аль-Фараби*

A. M. Baimukhametova¹, S. B. Baiseit¹, N. S. Ongarbayeva^{1,2},
M. G. Shamenova¹, T. I. Glebova¹

¹ *LLP Scientific Production Center for Microbiology and Virology,
Almaty, Republic of Kazakhstan*

² *al-Farabi Kazakh National University*

E-mail: biochem_vir@mail.ru

Аннотация

Результаты первичного скрининга носоглоточных смывов, собранных от людей в лечебных учреждениях различных регионов Казахстана, в РТ-ПЦР показали, что на территории Республики среди населения циркулируют вирусы гриппа А (H1N1 и H3N2) и типа В.

Abstract

The results from the primary RT-PCR-based screening of nasopharyngeal swabs collected from humans in healthcare facilities located in various regions of Kazakhstan showed that influenza A (H1N1 and H3N2) and type B viruses circulate among the population in the territory of the Republic.

© А. М. Баймухаметова, С. Б. Байсейіт, Н. С. Онгарбаева, М. Г. Шаменова, Т. И. Глебова, 2018.

*Исследования выполнены в рамках грантового проекта Комитета Науки Министерства Образования и Науки Республики Казахстан «Молекулярно-биологическая характеристика и антигенные свойства эпидемически значимых штаммов вирусов гриппа, циркулирующих в Республике Казахстан».

Вирусы гриппа острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) вызывают массовые вспышки заболеваний, принимающие почти ежегодно характер эпидемий. Грипп и ОРВИ остаются практически неконтролируемыми заболеваниями из-за высокой изменчивости антигенной структуры циркулирующих вирусов гриппа и гетерогенности возбудителей ОРВИ. Кроме того, вирусы гриппа и других ОРВИ способны изменять свои свойства и патогенность.

Для изучения циркуляции вирусов гриппа в лечебных учреждениях различных регионов Казахстана от людей с первичным диагнозом ОРВИ и ОРЗ собрано 205 носоглоточных смывов. В Атырауской области собрано 27 образцов, в Павлодарской — 52, в Карагандинской — 10, в Алматинской — 116 биопроб. Первичный скрининг образцов в РТ-ПЦР с использованием реагентов «АмплиСенс» (г. Москва, РФ) показал, что генетический материал вируса гриппа обнаружен в 28 смывах (13,66 % от общего числа исследованных проб). РНК вируса гриппа А — в 17 образцах (8,29 %), РНК вируса гриппа В — в 11 пробах (5,37 %). Субтипирование образцов, положительных на грипп типа А, выявило РНК вируса гриппа А/Н1N1 в девяти пробах (4,39 %), РНК вируса А/Н3N2 — в восьми образцах (3,90 %).

Таким образом, результаты первичного скрининга носоглоточных смывов в РТ-ПЦР показали, что на территории Республики среди населения циркулируют вирусы гриппа А (Н1N1 и Н3N2) и типа В.

АНАЛИЗ ЭПИДСИТУАЦИИ ПО ГРИППУ В 2017–2018 ГГ. В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН*

ANALYSIS OF THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION FOR INFLUENZA IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN IN 2017–2018

С. Б. Байсейіт, М. Қ. Қалқожаева, Г. В. Лукманова, Н. Г. Кливлеева

*ТОО «Научно-производственный центр микробиологии
и вирусологии», Алматы, Республика Казахстан*

S. B. Baiseit, M. K. Kalkozhayeva, G. V. Lukmanova, N. G. Klivleyeva

*LLP Scientific Production Center for Microbiology and Virology, Almaty,
Republic of Kazakhstan*

E-mail: biochem_vir@mail.ru

Аннотация

Из клинических образцов, собранных в эпидемический период 2017–2018 гг. в различных регионах Казахстана, выделены восемь гемагглютинирующих агентов: три — из карагандинских проб и пять — из алматинских. Идентификация восьми полученных инфекционных агентов, проведенная в РТГА и РИНА, показала принадлежность четырех изолятов к вирусам гриппа А/Н1N1, одного — к вирусам с антигенной формулой А/Н3N2 и трех штаммов — к вирусам гриппа типа В.

Abstract

Eight hemagglutinating agents were isolated from clinical samples collected during the 2017–2018 epidemic period in different regions of Kazakhstan: three from Karaganda samples and five from Almaty samples. Identification of eight resulting infectious agents, performed in the HAI assay and EIA, showed the belonging of four isolates to influenza A/H1N1 viruses, one to viruses with the antigenic formula A/H3N2, and three strains to influenza type B viruses.

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) и грипп являются одной из ведущих нозологических форм инфекционных заболеваний человека, причиняющих значительный вред здоровью населения. По соци-

© С. Б. Байсейіт, М. Қ. Қалқожаева, Г. В. Лукманова, Н. Г. Кливлеева, 2018.

* Исследования выполнены в рамках грантового проекта Комитета Науки Министерства Образования и Науки Республики Казахстан «Генетические детерминанты устойчивости казахстанских вирусов гриппа к химиопрепаратам».

альной значимости грипп находится на первом месте среди заболеваний. Ежегодно во всем мире вирусы гриппа вызывают эпидемические подъемы заболеваемости.

В результате заражения куриных эмбрионов 205 пробами, собранными от людей в различных регионах Казахстана, были выделены восемь гемагглютинирующих агентов: три — из карагандинских проб и пять — из алматинских.

Определение подтипа гемагглютинина в РТГА с использованием диагностических сывороток производства ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития (Россия, Санкт-Петербург) показало, что гемагглютинирующая активность четырех изолятов Алматы/04/18, Алматы/05/18, Караганда/14/18 и Караганда/15/18 подавлялась иммунными сыворотками к вирусам А/Н1Н1 и А/Н1Н1pdm (от 1/4 до гомологичного титра), трех вирусов Алматы/06/18, Алматы/07/18 и Алматы/08/18 — сывороткой к вирусу гриппа типа В (от 1/2 до гомологичного титра). Штамм А/Караганда/16/18 ингибировался сывороткой к вирусу А/Н3Н2 в 1/2 гомологичного титра.

Идентификация подтипа нейраминидазы, проведенная в РИНА, показала, что ферментативная активность изолятов с гемагглютинином А/Н1 подавлялась поликлональной диагностической сывороткой к вирусу А/Н1Н1, с гемагглютинином А/Н3 — сывороткой к вирусу А/Н3Н2 в титре 1:100.

Таким образом, идентификация в РТГА и РИНА, показала принадлежность двух алматинских изолятов (04/18 и 05/18) и двух карагандинских (14/18 и 15/18) к вирусам гриппа А/Н1Н1, карагандинского (16/18) — к вирусам гриппа А/Н3Н2 и трех алматинских (06/18, 07/18 и 08/18) — к вирусам гриппа типа В.

Полученные данные указывают на социркуляцию в эпидемический сезон 2017–2018 гг. среди населения Алматинской и Карагандинской областях вирусов гриппа А/Н1Н1, А/Н3Н2 и В.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ *IN VITRO* И *IN VIVO*

STUDY OF THE PROPERTIES OF THE ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Т. В. Бауэр, Т. В. Трегубчак, А. З. Максютлов,
И. В. Колосова, Е. В. Гаврилова, Р. А. Максютлов

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

T. V. Bauer, T. V. Tregubchak, A. Z. Maksyutov,
I. V. Kolosova, E. V. Gavrilova, R. A. Maksyutov

SRC VB «Vector», Russia

E-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru

Аннотация

Меланома — злокачественная опухоль, образующаяся при перерождении меланоцитов. Сейчас особое внимание уделяют методам биотерапии в борьбе с данным онкологическим заболеванием.

Целью исследования является получение онколитического вируса осповакцины и изучение его свойств на различных культурах клеток, а также в мышинной модели ксенографтов.

Abstract

Melanoma is a malignant tumor that occurs when melanocytes degenerate. Now special attention is paid to the methods of biotherapy in the fight against this cancer.

The aim of the study is to obtain the oncolytic vaccinia virus and to study its properties in various cell cultures, as well as in the xenograft mouse model.

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 поражением тканей организма [1].

Поскольку препараты химиотерапии являются низкоэффективными в отношении опухолевых клеток при данном онкологическом заболевании,

то при лечении меланомы применяют методы иммунотерапии [2]. Клинические исследования свидетельствуют о корреляции регрессии опухолей и активации опухолеспецифичных CD8⁺ и CD4⁺ Т-лимфоцитов, которые обнаруживают в периферической крови и удаленных метастазах. Активация цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL) происходит за счет гиперэкспрессии опухоль-ассоциированных антигенов (ОАА) на поверхности злокачественных клеток [3].

На данный момент разрабатывают и исследуют полиэпитопные ДНК-вакцины, но такие препараты показывают низкий иммуногенный эффект из-за малой вероятности попадания ДНК-препарата в клетки. Для решения данной проблемы в качестве способа доставки в организм целевой полиэпитопной конструкции был выбран вирус осповакцины (BOV), онколитические препараты на основе которого проходят клинические испытания.

В районы генов TK и VGF методом временной доминантной селекции произведена встройка гена, кодирующего гранулоцит-макрофагальный колониестимулирующий фактор, и искусственно синтезированного гена, кодирующего полиэпитопную конструкцию, направленную на стимуляцию Т-клеточного ответа против опухолевых клеток, соответственно. После чего полученный рекомбинантный вирус был изучен *in vitro*, а также в мышинной модели ксенографтов с использованием раковой культуры клеток SK-Mel-28.

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. 2017. Vol. 115.
- 2) Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB // Genome Research. 2012. Vol. 22. No. 9. P. 1790–1797.
- 3) Van Der Bruggen P1, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. // Immunol. Rev. 2002. No. 188. P. 51–64.

**ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИОФАГА KP8,
СПЕЦИФИЧНОГО К БАКТЕРИИ *KLEBSIELLA PNEUMONIA****

**GENOME ANALYSIS OF SPECIFIC TO *KLEBSIELLA PNEUMONIA*
BACTERIOPHAGE KP8**

О. В. Боковая^{1,2}, Ю. Н. Козлова¹, М. Р. Клопотова^{1,2}, В. В. Морозова¹

¹ ФГБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

² ФГАОУ ВО Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет

O. V. Bokovaya^{1,2}, Y. N. Kozlova¹, M. R. Klopotova^{1,2}, V. V. Morozova¹

¹ ICBFM SB RAS, Russia

² Novosibirsk State University, Russia

E-mail: bokovaya.o.v@gmail.com

Аннотация

Klebsiella pneumonia — оппортунистический патоген, вызывающий ряд инфекционных заболеваний, и для которого характерно возникновение множественной лекарственной устойчивости. Бактериофаг KP8, специфичный к штамму *Klebsiella pneumonia* КЭМТК356, был выделен и наработан. Геномная ДНК фага была выделена, и было проведено полногеномное секвенирование. Полученная последовательность была аннотирована. Размер генома составил 73679 т.п. и содержит 94 предполагаемых ОРТ. G+C состав генома — 44,2 %. Более половины предполагаемых ОРТ имеют неизвестные функции, в то время как 23 ОРТ имеют гомологию с генами фагов семейства *Podoviridae* и родов *N4virus* и *G7cvirus*. Шесть ОРТ были отнесены к кластеру структурных генов с известной функцией. Литическая кассета состоит из эндוליзина, Rz/RzI спанина и предположительно холина. Концевые повторы генома фага составили 404 п.н. По морфологии вириона фаг также был отнесен к семейству *Podoviridae*.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogen that causes a number of infectious diseases and some strains of which are antibiotic resistant. Bacteriophage KP8 specific to *Klebsiella pneumoniae* strain CEMTC356 was isolated and propagated. The genomic phage DNA was isolated. The phage genome was determined and annotated. The genome size is 73679 bp.

The phage genome contains 94 putative ORFs. G+C content of the genome is 44.2%. More than a half of the putative ORFs have unknown functions while 23 ORFs have homology with the genes of the *Podoviridae* phages (*N4virus* and *G7cvirus* genera). Six ORFs belonged to a cluster of structural genes with known function. The lytic cassette contains endolysin, Rz/Rz spanin and putative holin. The phage genome terminal repeats have length 404 bp. Phage KP8 was assigned to the *Podoviridae* family by electron microscopy methods.

Klebsiella pneumonia — это грамм-негативный оппортунистический патоген, ассоциированный с инфекционной пневмонией, инфекциями уrogenитального тракта и некоторыми другими инфекциями, включая нозокомиальные. Известно, что у некоторых штаммов рода *Klebsiella* возникает устойчивость к антибиотикам, так, например, в 2017 году стало известно о первом штамме, который был устойчив ко всем известным 26 антибиотикам. Коктейли бактериофагов против лекарственно-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumonia* могут быть использованы как биологическое лекарство.

Бактериофаг KP8, специфичный к штамму *Klebsiella pneumonia* КЭМТК356, был выделен в лаборатории молекулярной микробиологии из образцов фекалий животных. Фаговые частицы были размножены, после чего была выделена геномная ДНК бактериофага. Далее была наработана библиотека нуклеотидных последовательностей, и было проведено полное секвенирование бактериофага KP8.

Геномная последовательность фага KP8 была аннотирована и исследована. Размер генома составил 73679 т.н.п. и содержит 94 предполагаемых ОРТ. G+C состав генома — 44,2 %. Из 94 ОРТ более половины гипотетические и имеют неизвестные функции, в то время как 23 ОРТ имеют гомологию с генами фагов семейства *Podoviridae* и родов *N4virus* и *G7cvirus*. Были обнаружены ОРТ с функциями, отвечающими за метаболизм ДНК и РНК (репликация, транскрипция), упаковку ДНК в незрелый капсид и морфогенетические функции. Геном фага KP8 содержит три ОРТ, кодирующие ответственные за экспрессию ранних и поздних генов РНК полимеразы. За процесс репликации фага KP8 отвечают ДНК геликаза, ДНК полимеразы I, ДНК праймаза, белок, связывающий одноцепочечную ДНК и гПА- and гПВ-подобные белки. Большая и малая субъединицы терминазы осуществляют упаковку ДНК в незрелую головку. Кластер структурных белков был обнаружен, но только 6 ОРТ имеют определенную известную функцию. Литическая кассета состоит из эндолизина, Rz/RzI спанина и предположительно холина. Концевые повторы генома фага составили 404 п.н.

Морфология вириона была выявлена с помощью трансмиссионной электронной микроскопии, которая подтвердила, что бактериофаг относится к семейству *Podoviridae*.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКТА КЛУБНЕЙ ЦИКЛАМЕНА
ЕВРОПЕЙСКОГО В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА ТРИВАЛЕНТНОЙ
ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ
ИММУНИЗАЦИИ МОРСКИХ СВИНОК**

INTRANASAL IMMUNIZATION OF GUINEA PIG USING TRIVALENT
INFLUENZA ANTIGEN ADJUVANTED
WITH CYCLAMEN EUROPAEUM TUBERS EXTRACT

А. С. Гудымо, В. А. Евсеенко, Н. П. Колосова, С. В. Мальцев,
Ю. А. Буланович, Н. И. Гончарова, Н. В. Данильченко, В. Ю. Марченко,
И. М. Суслопаров, А. Б. Рыжиков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

A. S. Gudymo, V. A. Evseenko, N. P. Kolosova, S. V. Maltsev, J. A. Bulanovich,
N. I. Goncharova, N. V. Danilchenko,
V. Yu. Marchenko, I. M. Susloparov, A. B. Ryzhikov

FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

Аннотация

Экстракт клубней цикламена европейского (СТЕ) с концентрацией обычно применяемой для лечения риносинуситов у человека был применён как муконазальный адъювант при экспериментальной интраназальной иммунизации морских свинок концентрированной коммерчески доступной тривалентной гриппозной вакциной с последующим инфицированием штаммом A/California/04/2009 H1N1pdm09.

Двойная интраназальная иммунизация вакцинным препаратом, состоящим из 7,5 мкг каждого гемагглютинина и 500 мкг СТЕ в 50 мкл, индуцировало ответ на 21 сутки после иммунизации, детектируемый в реакции торможения гемагглютининации (РТГА), средний геометрический титр (GMT (max-min)) составил 40 (5-640) против H1N1pdm; 43 (5-1280) против H3N2; 11 (5-80) против гриппа В. Только по одному животному, иммунизированному внутримышечно и интраназально, были защищены от заражения. Эти животные имели обратные титры в РТГА на 55 день после иммунизации равные 1/320 против антигена H1N1pdm полученного в развивающемся курином эмбрионе (РКЭ).

Эти данные показывают, что эффективность СТЕ как интраназального адъюванта может быть измерена стандартными методами, применяемыми для государственной сертификации инактивированных гриппозных вакцин.

© А. С. Гудымо, В. А. Евсеенко, Н. П. Колосова, С. В. Мальцев, Ю. А. Буланович, Н. И. Гончарова, Н. В. Данильченко, В. Ю. Марченко, И. М. Суслопаров, А. Б. Рыжиков, 2018.

Abstract

Cyclamen europaeum tubers extract (CTE) with concentration commonly used for human rhinosinusitis treatment was tested as mucosal adjuvant in experimental intranasal immunization of guinea pigs with concentrated commercially available influenza trivalent vaccine and subsequent infection with influenza strain A/California/04/2009 H1N1pdm.

Dual intranasal immunization with vaccine compound consisting of 7.5 µg of each hemagglutinin and 500 µg of CTE in 50 µl induced reciprocal GMT (max-min) on day 21 after immunization 40 (5-640) against H1N1pdm; 43 (5-1280) against H3N2; 11 (5-80) against influenza B. Only one animal immunized intramuscularly and intranasally, were protected from infection. These animals had inverse titers 55 days after immunization equal to 1/320 against the H1N1pdm-egg.

These data show that the effectiveness of CTE as an intranasal adjuvant can be measured by standard methods used for national certification of inactivated influenza vaccines.

Введение

Практически вся вакцинация сегодня проводится с использованием вакцин с парентеральным путём введения. Муконазальная вакцинация предполагает несколько преимуществ, в сравнении с парентеральными путями введения, такие как: упрощение применения, возможность самостоятельного применения, индукция мукозального и системного иммунитета с кросс-протективным эффектом. В тоже время, муконазальные вакцины должны преодолеть несколько значимых барьеров, таких как разведение и распределение, соревнование с мириадами различных живых размножающихся бактерий, вирусов, инертных частиц пыли, ферментативное разложение и низкий рН до достижения целевых клеток иммунной системы.

Кандидатный адъювант был найден в группе риносинуситных препаратов. Мы выбрали экстракт клубней цикламена европейского (СТЕ).

Целью данного исследования было идентифицировать потенциальные свойства СТЕ как адъюванта инактивированной вакцины против гриппа для интраназального введения и показать его эффективность на животной модели млекопитающего.

Схема эксперимента и результаты

До начала эксперимента коммерчески доступная инактивированная расщеплённая вакцина от гриппа, содержащая антигены A/California/07/2009 H1N1pdm-like, A/Switzerland/9715293/2013 H3N2-like and B/Phuket/3073/2013-like полученные в РКЭ, была сконцентрирована до 300 мкг каждого гемагглютинина/мл. Концентрация СТЕ равная 10 мг/мл была выбрана после превичных тестов на BALB/c мышах; эта концентрация используется для лечения риносинусита у людей.

Иммунизация. Модельными животными для проведения эксперимента являлись морские свинки весом 190 ± 10 грамм. Было выделено 4 группы: Группа 1 (5 животных) для положительного контроля антигена, Группа 2 (10 животных) для интраназальной экспериментальной вакцинации, Группа 3 (5 животных) для интраназальной иммунизации антигена и Группа 4 (5 животных) для интраназального отрицательного контроля (без антигена, только СТЕ). Животным из Группы 4 вводилось по 50 мкл СТЕ 10 мг/мл на 4 и 1 день перед иммунизацией для подтверждения переносимости морскими свинками рекомендованной для человека дозы. Группа 1 иммунизировалась в бедренную мышцу 15 мкг каждого антигена в объёме 50 мкл. Группа 2 интраназально иммунизировалась 50 мкл препарата, состоящего из 7,5 мкг каждого антигена и 500 мкг СТЕ, процедура выполнялась 1 мл шприцем с распылителем, предназначенным для человека. Животным из Группы 3 интраназально вводили только антиген (50 мкл, состоящего из 7,5 мкг каждого гемагглютинина). На 14 сутки после первой иммунизации животные из Группы 2 и 3 были повторно иммунизированы идентичным препаратом. Забор крови происходил до иммунизации и на 14, 21 и 55 сутки после иммунизации.

Вirus и инфицирование животных. На 56 день после первой иммунизации животных подвергали инфицированию. Для инфицирования 200 мкл разведённой культуральной жидкости штамма вируса гриппа A/California/04/2009 H1N1pdm09 с титром $4.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ вводили интраназально. Назальные смывы отбирались с 3 по 7 сутки после инфицирования.

Титры в РТГА сгруппированы в таблицу 1. Степень сероконверсии определяли как количество животных с обратным титром превакцинации $\geq 1:10$ и по меньшей мере 4-кратным увеличением послевакцинационного ответного титра $\geq 1:40$. Степень серопротекции определялась как количество животных, у которых обратные HI-титры составили $\geq 1:40$. Нижний предел количественного определения для анализа HI составлял $1:10$; образцы $< 1:10$ считались серонегативными и получили значение 5 для расчета среднего геометрического титра (GMT).

Все животные Группы 1, иммунизированные внутримышечно, сформировали сравнительно высокие и протективные титры ($> 1/40$) на 14 сутки после введения компонентов Н1, Н3 и В вакцины и оставались постоянными до инфицирования. Все животные Групп 3 и 4 имели титры в РТГА $< 1/10$ в сыворотке собранной в ходе всех заборов на все компоненты вакцины. В отличие от Группы 1, на 14 сутки после иммунизации только 2 из 10 животных экспериментальной Группы 2 имели определяемые в РТГА титры и только на компоненты Н3 и В. На 21 сутки после первой иммунизации у 5 из 10 животных Группы 2, значительно увеличились обратные HI-титры

**Гуморальный гемагглютинин-ингибирующий ответ.
Данные рассчитаны и представлены как обратные HI-титры**

Штамм	d.p.i.	Группа 1 (положительный контроль антигена)		Группа 2 (интраназальная иммунизация адьювант + антиген)		Группа 3 (интраназальная иммунизация антигена)		Группа 4 (интраназальная иммунизация адьюванта)	
		GMT (min – max)	GMT p=0,95 CI	GMT (min – max)	GMT p=0,95 CI	GMT (min – max)	GMT p=0,95 CI	GMT (min – max)	GMT p=0,95 CI
A California 07 2009 H1N1pdm-egg	14	92 (80–160)	120–70	5	N.C.	5(5–5)	N.C.	5(5–5)	N.C.
	21	211 (160–320)	294–151	40 (5–640)	246–6				
	55	242 (160–320)	338–174	29 (5–320)	122–7	N.D.	N.D.		
A Switzerland 9715293/2013 H3N2-egg	14	139 (40–320)	271–71	6 (5–40)	12–4	5(5–5)	N.C.	5(5–5)	N.C.
	21	278 (80–640)	615–126	43 (5–1280)	302–6				
	55	184 (160–320)	241–140	27 (5–320)	89–8	N.D.	N.D.		
B Phuket 3073 2013 B-Yamagata-egg	14	46 (40–80)	60–35	5(5–10)	6–4	5 (5–5)	N.C.	5(5–5)	K.C.
	21	53 (20–80)	91–31	11(5–80)	28–4				
	55	40 (20–80)	61–26	10 (10–80)	26–4	X.D.	X.D.		

и достигли протективного уровня. На 55 сутки титры понизились, но для 5 животных они остались $>1/40$ к антигену A/California/07/09 H1N1pdm09, наработанному в РКЭ.

ОТ-ПЦР анализ назальных смывов показал, что только по одному животному из Групп 1 и 2 не заразились и имели титр в РТГА равный $1/320$ против антигена A/California/07/09 H1N1pdm09, полученного на РКЭ и это обеспечило протективность от заражения. Остальные животные из этих групп с более низкими титрами заразились. Все животные из Группы 3 и 4 имели вирусную РНК в назальных смывах.

Выводы

Двойная интраназальная иммунизация вакцинным препаратом, состоящим из 7,5 мкг каждого гемагглютинина и 500 мкг СТЕ в 50 мкл, индуцировало ответ на 21 сутки после иммунизации, детектируемый в РТГА, средний геометрический титр (max-min) составил 40 (5–640) против H1N1pdm; 43 (5–1280) против H3N2; 11 (5–80) против гриппа В.

Только одно животное иммунизированное интраназально, было полностью защищено от заражения A/California/04/2009 H1N1pdm09. Это животное имело обратные титры в РТГА равные $1/320$ против антигена, полученного в РКЭ перед заражением на 55 день после иммунизации. Эти данные показывают, что эффективность СТЕ как интраназального адьюванта может

быть измерена стандартными методами, применяемыми для государственной сертификации инактивированных гриппозных вакцин.

Суммируя полученные данные, мы приходим к выводу, что экстракт клубней цикламена европейского и его природные или синтетические аналоги могут далее рассматриваться и изучаться как сравнительно безопасный муконазальный адъювант.

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

INTEGRATIVE AND EPISOMAL FORMS 16 GENOTYPES OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS FOR CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA AND CERVICAL CANCER

И. В. Дерюшева¹, М. К. Ибрагимова^{1,2}, М. М. Цыганов^{1,2}

¹ *НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия*

² *НИ Томский государственный университет, Томск, Россия*

E-mail: imk1805@yandex.ru

Аннотация

В исследование включено 148 пациенток с предраковыми патологиями шейки матки (цервикальная интраэпителиальная неоплазия 1-й степени (LSIL) и цервикальная интраэпителиальная неоплазия II-III степени (HSIL)) и пациентки с диагнозом рак шейки матки I-IV стадии, которые были инфицированы вирусом папилломы человека (ВПЧ), а также женщины с отсутствием патологических изменений в слизистой оболочке шейки матки. Комплексное обследование включало гинекологический осмотр, кольпоскопию, цитологическое и гистологическое исследование, обнаружение и генотипирование вируса папилломы человека высокого риска, исследование вирусной нагрузки и физического статуса ДНК ВПЧ16.

Abstract

The study involved 148 patients with precancer (cervical intraepithelial neoplasia grade I (LSIL) and cervical intraepithelial neoplasia grade II-III (HSIL)) and the stage I-IV cervical cancer patients which were infected with human papillomavirus (HPV), and women with no pathological changes in cervical mucous. The comprehensive survey included colposcopy, cytological and histological analysis, detection and genotyping of high-risk human papillomavirus, viral load and physical status of HPV16 DNA was evaluated in cases of mono-infection.

Актуальность

В инфицированной клетке вирус папилломы человека (ВПЧ) может существовать в эписомальной форме (вне хромосом клетки) — считается доброкачественной, интегрированной (встроенной в геном клетки) — расце-

© И. В. Дерюшева, М. К. Ибрагимова, М. М. Цыганов, 2018.

* Работа выполнена в рамках программы «УМНИК» фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (договор № 11852ГУ/2017).

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

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

Материал и методы

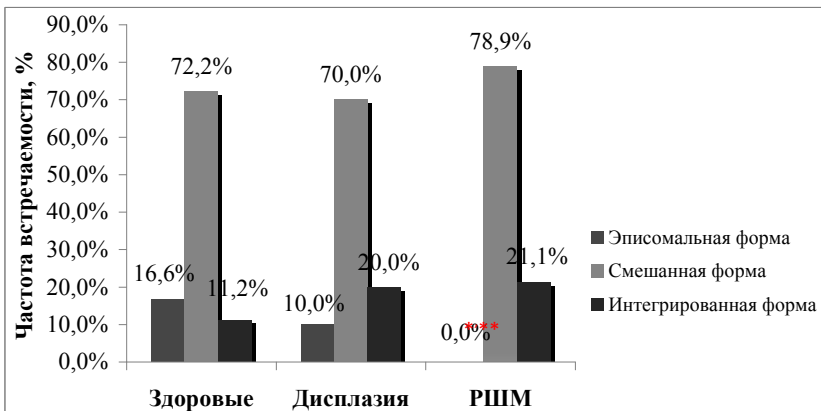
Вирусологическое исследование было проведено 148 женщинам Томской области в возрасте от 20 до 76 лет, проходивших осмотр (условно здоровые женщины) и/или получавших лечение в Томском НИИ онкологии (с различными патологиями шейки матки). Все пациентки являлись носителями моноинфекции ВПЧ 16 генотипа.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

Результаты и обсуждение

При сравнении частоты встречаемости клинически значимой ВН для выбранных ВПЧ16+ пациенток, было показано, что частота встречаемости вы-

сокой вирусной нагрузки у пациенток групп CIN II-III и всех больных РШМ статистически значимо превышает частоту встречаемости высокой вирусной нагрузки для группы здоровых женщин (p от $1,98 \cdot 10^{-7}$ до 0.004). Также было показано, что частота встречаемости высокой ВН у пациенток групп РШМ I-II, РШМ III-IV и общей группы с диагнозом РШМ (РШМ I-IV) статистически значимо превышает частоту встречаемости клинически значимой вирусной нагрузки для группы пациенток с CIN I (p от 0.001 до 0.01).

Следующим этапом работы была оценка частоты интеграции ВПЧ 16 генотипа в ДНК на изучаемой выборке. Частота интегрированных форм составила: в группах с патологией шейки матки (CINI-III и РШМ I-IV) была в два раз выше, чем у условно здоровых (см. рисунок). Частота смешанных форм в группе РШМ I-IV была несколько выше, чем у здоровых и пациенток с дисплазией. Частота эписомальных форм ВПЧ снижалась по мере утяжеления диагноза и была равна 0 в группе РШМ I-IV. Статистически значимые различия по частоте встречаемости различных форм ВПЧ 16 в группах наблюдения на уровне $p < 0,002$ выявлены для эписомальной формы ВПЧ 16 типа в группе больных РШМ (по сравнению с группой здоровых лиц, $OR(95CI\%) = 1.2$ (1.081.48), а также для группы больных РШМ по сравнению с группой больных дисплазией эпителия шейки матки ($p=0,02$, $OR(95CI\%) = 1.11$ (1.01–1.22)). Для смешанной и интегрированной формы



Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с группой здоровых лиц, $p < 0,05$; ** - различия статистически значимы по сравнению с группой больных дисплазией эпителия шейки матки, $p < 0,05$

Частота встречаемости различных форм ВПЧ 16 в группах наблюдения

ВПЧ статистически значимых различий выявлено не было (см. рисунок). Сравнение распределения частот всех трех форм (эписомальной, смешанной и интегрированной) между больными РШМ и CIN I-III в таблице 2x3 (тест хи-квадрат) показало, что распределение частот форм вируса статистически значимо различается на уровне значимости 95 % ($p=0,04$).

Заключение

Несмотря на то, что риск заражения женщин ВПЧ в течение жизни достаточно высок, наличие эписомальной формы ВПЧ не является прогностически неблагоприятным фактором, так как у большей части пациенток происходит его элиминация. Предполагается, что интегрированная форма вируса дольше сохраняется, благодаря чему обнаруживается в эпителиальных дисплазиях высокой степени и РШМ, вызывает пролиферативные процессы в клетках, геномную нестабильность и формирование мутаций. Таким образом, интеграция ДНК ВПЧ в ДНК клетки-хозяина является ключевым событием в трансформации эпителиальных клеток.

**ИНДУКЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА Y,
ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК***

**INDUCTION OF IGY,
AGAINST HEMORRHAGIC FEVERS PATHOGENS**

А. В. Зыбкина, О. А. Полежаева, Д. Н. Щербаков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

A. V. Zybkina, O. A. Polezhaeva, D. N. Scherbakov

SRC VB "Vector", Russia

Аннотация

Проведена иммунизация кур, направленная на формирование антител нейтрализующих вируса Эбола и вируса Марбург. В качестве иммуногена использованы вирусоподобные частицы псевдотипированные поверхностными гликопротеинами этих вирусов. При помощи псевдовиральной системы определены IC₅₀ препаратов нейтрализующих антител накапливающиеся в желтках иммунизированных птиц, составившие для вирусов Эбола и Марбург 1/5120 и 1/256 соответственно.

Abstract

The immunization of the hens aimed at the formation of antibodies neutralizing the Ebola virus and the Marburg virus was carried out. The virus-like particles pseudotyped with surface glycoproteins of these viruses were used as an immunogen. Using the pseudovirus system, IC₅₀ preparations of neutralizing antibodies accumulating in the yolks of immunized birds were determined, which were for viruses Ebola and Marburg 1/5120 and 1/256, respectively.

Вирусы Эбола и Марбург входят в семейство *Filoviridae*. Оба патогена способны вызывать геморрагическую лихорадку, с уровнем летальности до 90 %. Начиная с середины 80-х годов ведутся поиски терапевтических средств для борьбы с филовирусами. Несмотря на значительные усилия, одобренные препараты до сих пор отсутствуют. Для создания терапевтических препаратов предложен ряд подходов, таких как постконтактные вакцины, миРНК, олигомеры и моноклональные антитела. Последние, по показателям безопасности и специфичности действия, несомненно, занима-

© А. В. Зыбкина, О. А. Полежаева, Д. Н. Щербаков, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00512 мол_а и научного проекта №18-04-00458 А.

ют лидирующие позиции. Ключевым этапом создания эффективных моноклональных антител является получение разнообразия антител, способных нейтрализовать патоген. Достичь этой цели можно разными путями, в том числе с использованием различных схем иммунизаций лабораторных животных.

В работе, для индукции IgY антител, способных нейтрализовать филорвирусы, было апробировано несколько вариантов иммунизации. В качестве иммуногенов использовали псевдовиральные частицы двух типов, лентивирусные и рабдовирусные. Для «сборки» лентивирусных частиц проводили ко-трансфекцию клеток HEK293T двумя плазмидами, pSG3Δenv и плазмидой, содержащей последовательность поверхностного гликопротеина GP Эбола. Для получения частиц на основе «ядра» вируса везикулярного стоматита (ВВС), сначала проводили трансфекцию клеток HEK293T плазмидой, содержащей последовательность поверхностного гликопротеина GP Эбола (или Марбург), спустя сутки добавляли псевдовиралы ВВС.

Для иммунизации было сформировано пять групп кур — две для вируса Марбург и три для вируса Эбола. Промежуток между иммунизациями составлял 3 недели. Вводимые разным группам иммуногены представлены в таблице.

Состав использованных иммуногенов

Номер группы	Количество животных	Иммуноген
Вirus Эбола		
1	2	Лентивирусные частицы, экспонирующие на своей поверхности GP вируса Эбола
2	2	Рабдовирусные частицы, экспонирующие на своей поверхности GP вируса Эбола
3	2	Смесь рабдовирусных и лентивирусных частиц в соотношении 50/50
Вirus Марбург		
4	3	Рабдовирусные частицы, экспонирующие на своей поверхности GP вируса Марбург
5	3	Рабдовирусные частицы, экспонирующие на своей поверхности GP вируса Марбург в комплексе с НАФ

Препараты IgY антител выделяли из желтка при помощи метода изоэлектрического осаждения. Оценку вируснейтрализующих антител проводили при помощи псевдовиралов ВВС псевдотипированных поверхностным гликопротеином вируса Эбола (Марбург).

В группах 1, 2 и 3 (Эбола) было проведено шесть иммунизаций. Нейтрализующие антитела детектировались уже после первой иммунизации, спустя 10 дней. Наибольший уровень нейтрализации (1/5120) был зафиксирован в группе 3 после шестой иммунизации.

В группах 4 и 5 (Марбург), нейтрализующие антитела накапливались значительно медленнее, поэтому было принято решение провести буст-иммунизацию. После шести иммунизаций, провели две дополнительные иммунизации с использованием в качестве иммуногена смеси псевдовирюсов, состоящей на 50 % из рабдовирусных частиц, несущих на своей поверхности GP штамма *Porr* с делецией муциноподобного домена и на 50 % из лентивирусных частиц, несущих на своей поверхности GP штамма *DRC* с делецией муциноподобного домена. В результате были получены препараты антител, нейтрализующие псевдовирюсы Марбург в разведении 1/256. Необходимо так же отметить что наибольший уровень нейтрализации был зарегистрирован для антитела, полученных от птиц, иммунизированной по схеме с добавлением неполного адьюванта Фрейнда (5 группа).

БЕЗРЕЦИДИВНАЯ И ОБЩАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫМ И ВПЧ-НЕГАТИВНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ *

**DISEASE-FREE AND OVERALL SURVIVAL OF PATIENTS DIAGNOSED
WITH HPV-ASSOCIATED OR HPV-NEGATIVE CERVICAL CANCER**

М. К. Ибрагимова^{1,2}, И. В. Дерюшева¹,
Ю. А. Небова^{1,2}, М. М. Цыганов^{1,2}

¹ *НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия*

² *НИ Томский государственный университет, Томск, Россия*

E-mail: imk1805@yandex.ru

Аннотация

Методом ПЦР в режиме реального времени исследованы соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки 116 больных первичным РШМ I-IV стадий в возрасте от 24 до 79 лет. У 84 (72,4 %) больных установлено наличие вируса папилломы человека (ВПЧ) высокого канцерогенного риска (ВКР), у 32 больных (27,6 %) наличие вируса в опухоли не было выявлено. Показано достоверное снижение выживаемости, а также преобладание худшего прогноза для больных ВПЧ-негативным раком шейки матки.

Abstract

The real-time PCR method is used to study scrapings of cervical epithelium and outer portion of the cervix in 116 patients aged 24–79 years with stage I–IV primary cervical cancer. The comprehensive survey included colposcopy, cytological and histological analysis, detection and genotyping of high-risk human papillomavirus. In 84 patients (72.4 %) the presence of human papillomavirus (HPV) of high carcinogenic risk (HCR) is found, in 32 patients (27.6 %) the presence of the virus has not been inspected in the tumor. A significant decrease in the survival rate as well as the prevalence of the worst prognosis for patients with HPV-negative cervical cancer are shown.

Введение

В настоящее время ВПЧ является основным этиологическим фактором в развитии рака шейки матки (РШМ). По данным различных исследований до 80–90 % больных РШМ являются носителями ВПЧ ВКР, соответственно, в до 20 % ДНК опухоли шейки матки не содержит вируса. Это дает основание предполагать, что незначительное число опухолей могут возникать без

© М. К. Ибрагимова, И. В. Дерюшева, Ю. А. Небова, М. М. Цыганов, 2018.

* Работа поддержана грантом РФФИ 18-44-703004 «Физический статус вируса папилломы человека и прогрессия цервикальной интраэпителиальной неоплазии».

участия данной группы вирусов (или вирус элиминируется в процессе канцерогенеза), т. е. являются ВПЧ-негативными. Есть мнение, что обнаружение данного подтипа РШМ, не ассоциированного с наличием вируса, возможно лишь при наличии погрешностей при проведении лабораторных исследований. Есть и другой взгляд на данный феномен — ВПЧ-негативные опухоли не только возникают наряду с ВПЧ-ассоциированным РШМ, но и принадлежат к более агрессивной группе и их канцерогенез существенно отличается от механизма развития ВПЧ-положительных опухолей.

Цель работы: оценка безрецидивной и общей выживаемости ВПЧ-положительных и ВПЧ-негативных больных первичным РШМ.

Материалы и методы

В исследование было включено 116 пациенток в возрасте от 24 до 79 лет с первичным РШМ I-IV стадий. Диагноз верифицирован гистологически, опухоли были охарактеризованы в соответствии с классификацией FIGO (классификация Международной федерации акушеров и гинекологов). Комплексное обследование включало гинекологический осмотр, кольпоскопию, цитологическое и гистологическое исследование, что позволило верифицировать диагноз. Материалом для исследования служили соскобы эпителия цервикального канала и наружной части шейки матки.

Выявление и генотипирование ДНК ВПЧ проводили методом PCR в режиме реального времени на приборе RotorGene 6000 («Corbett Research», Австралия) с использованием комплектов реагентов фирмы «Amplisens®» (Москва, Россия). Значение вирусной нагрузки рассчитывалось в геномных эквивалентах ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток, порог релевантного количества вируса принимался равным 3 lg ДНК ВПЧ / 10^5 клеток в соскобе. Для оценки статистической значимости различий в распределении частот качественных признаков между группами использовали критерий Фишера. Оценку выживаемости проводили по методу Каплана-Майера.

Результаты и обсуждение

Наличие ВПЧ+ РШМ, ассоциированного с одним или одновременно с несколькими типами ВПЧ, были обнаружены у 84 пациенток (72,4 %) и у 32 больных (27,6 %) ВПЧ в опухоли не был выявлен.

В зависимости от инфицированности ВПЧ, женщины были разделены на 2 группы наблюдения: группа 1 — ВПЧ-положительные женщины ($n=84$), средний возраст $42,1 \pm 1,7$ лет; группа 2 — ВПЧ-негативные женщины ($n=32$), средний возраст $45,5 \pm 1,6$ лет. Группы не различались по основным клинико-патологическим показателям: размеру опухолей, лимфогенному метастазированию и гистотипу (данные не представлены).

Генотипирование ВПЧ-положительных образцов выявило, что 16 генотип ВПЧ встречается в 67,8 % случаев. Это согласуется с литературными данными и полученными ранее результатами. Второе и третье ранговое место занимают ВПЧ 33 и 31 типов (22,6 % и 20,2 % соответственно). В то время как согласно литературным данным, во многих регионах мира ВПЧ18 типа занимает по распространению второе место. При определении вирусной нагрузки (концентрации ДНК вируса) в исследуемых образцах было показано, что количество пациенток с показателем низкой вирусной нагрузки ($< 3 \lg$ ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток), для которой показана слабая связь с риском развития РШМ [10], в группе обследуемых женщин составило 22,6 %, при этом, показатель высокой (клинически значимой вирусной нагрузки $> 3 \lg$ ДНК ВПЧ/ 10^5 клеток), для которого показан высокий уровень корреляции с риском возникновения РШМ, составил 77,4 %.

При исследовании выживаемости в группах было обнаружено снижение как общей, так и безрецидивной выживаемости больных РШМ в группе ВПЧ-отрицательных пациенток. На рис. 1 и 2 представлена безрецидивная и общая выживаемость больных РШМ: сроки наблюдения безрецидивной выживаемости для групп ВПЧ-положительных и ВПЧ-отрицательных пациенток оставили 102 и 68 месяцев, общей — 52 и 83 месяца, соответственно. 2-летняя безрецидивная выживаемость в данных группах составила 92,0 % и 73,0 %, общая — 86,0 % и 65,0 %. Можно полагать, что преоблада-

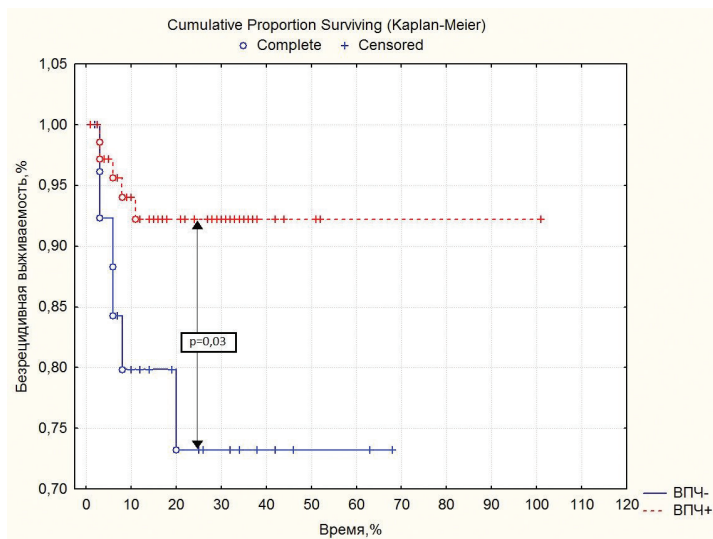


Рис. 1. Безрецидивная выживаемость больных РШМ

ние среди ВПЧ-отрицательных РШМ более агрессивных форм неслучайно и снижение выживаемости таких пациенток может быть обусловлена иными механизмами канцерогенеза РШМ, что может объяснять причину различий в исходе заболевания. В работе Nagima и соавторов было показано, что ВПЧ-негативные раки — отдельная группа и именно этот подтип наиболее плохо поддается действию лучевой терапии. Еще в 2006 году появилось сообщение, где была исследована вирусная нагрузка ВПЧ в соскобах эпителиальных клеток шейки матки больных РШМ до лечения. Было показано, что по степени тяжести прогноза заболевания РШМ находятся в следующей иерархии: ВПЧ-положительные опухоли с высокой вирусной нагрузкой, ВПЧ-положительные опухоли с низкой вирусной нагрузкой и наиболее плохой прогноз у ВПЧ-негативных опухолей.

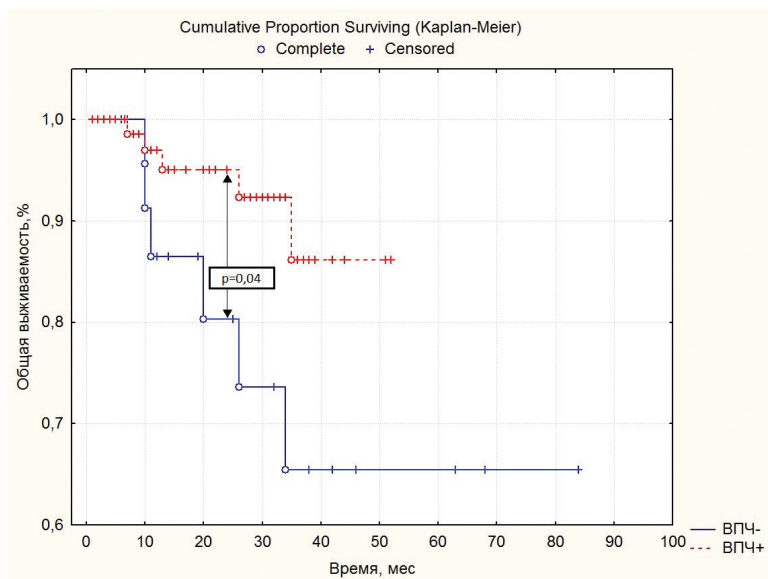


Рис. 2. Общая выживаемость больных РШМ

Заключение

ВПЧ-негативные опухоли шейки матки встречаются в два с половиной раза реже, чем ВПЧ-положительные, но имеют значительно худший прогноз. Наличие/отсутствие ДНК ВПЧ в опухоли может стать новым, независимым прогностическим фактором для РШМ. Патогенез РШМ, не связанного с наличием ВПЧ изучен слабо и необходимо его более детального исследование.

**СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
НА ГРИПП ПОПУЛЯЦИИ СВИНЕЙ
В КОСТАНАЙСКОЙ ОБЛАСТИ КАЗАХСТАНА В 2018 Г.***

SEROLOGICAL STUDIES FOR INFLUENZA
AMONG SWINE POPULATION IN KOSTANAI OBLAST
OF KAZAKHSTAN IN 2018

М. Қ. Қалқожаева, Н. Т. Сактаганов,
А. М. Баймухаметова, Н. Г. Кливлеева

*ТОО «Научно-производственный центр микробиологии
и вирусологии», Алматы, Республика Казахстан*

M. K. Kalkozhayeva, N. T. Saktaganov,
A. M. Baimukhametova, N. G. Klivleyeva

*LLP Scientific Production Center for Microbiology and Virology,
Almaty, Republic of Kazakhstan*

E-mail: biochem_vir@mail.ru

Аннотация

В животноводческих хозяйствах Костанайской области от свиней 4–5-месячного возраста для серологических исследований собрано 39 сывороток крови. Результаты серологических исследований в РТГА и ИФА, указывают на социркуляцию вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 среди свиней в Костанайской области.

Abstract

39 blood serums were collected from swine aged 4–5 months for serological studies in the cattle-breeding farms of Kostanai oblast. The results from serological studies in the HAI assay and EIA indicate the co-circulation of influenza A/H1N1 and A/H3N2 viruses among swine in Kostanai oblast.

Вирус гриппа является как в мире, так и в Казахстане широко распространенным и значимым возбудителем респираторного заболевания у свиней. Эпизоотии среди животных имеют большое социальное значение в свя-

© М. Қ. Қалқожаева, Н. Т. Сактаганов, А. М. Баймухаметов, Н. Г. Кливлеева, 2018.

*Исследования выполнены в рамках грантового проекта Комитета Науки Министерства Образования и Науки Республики Казахстан «Молекулярно-генетическая изменчивость вирусов гриппа свиней в Казахстане».

зи со способностью вируса к реассортации и возникновению штаммов высокопатогенных для людей [Кливлеева Н. Г., 2017; Сактаганов Н. Т., 2017].

Серологическое исследование сывороток крови на наличие антител к вирусам гриппа в РТГА проводили с использованием диагностикумов производства ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития (Россия, Санкт-Петербург), в ИФА — тест-систем производства ООО «ППДП» (Россия, Санкт-Петербург).

В животноводческих хозяйствах Костанайской области от свиней 4–5-месячного возраста для серологических исследований собрано 39 сывороток крови.

Результаты серологических исследований сывороток крови в РТГА показали, что наибольшее количество положительных образцов выявлено к вирусу гриппа А/Н3N2 — в 23,08 % (девять образцов) от общего числа исследованных сывороток, к А/Н1N1 — в 7,69 % (три образца), к А/Нsw1N1 в 2,56 % случаев (одна проба). Титры антител составили 1:20–1:40.

Серологический анализ сывороток крови свиней в ИФА позволил выявить антитела только к вирусу гриппа А/Н3N2 в 15,38 % (6 образцов).

Таким образом, результаты серологических исследований сывороток крови собранных в 2018 г. в Костанайской области указывают на социркуляцию среди свиней вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2.

**ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСА БОЛЕЗНИ
НЬЮКАСЛА, ИЗОЛИРОВАННОГО ОТ СИЗОГО ГОЛУБЯ
В ЮЖНОМ КАЗАХСТАНЕ В 2015 ГОДУ**

FULL GENOM ANALYSIS OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS
ISOLATED FROM ROCK DOVE
IN SOUTHERN KAZAKHSTAN IN 2015

Е. Т. Касымбеков, К. О. Карамендин, А. И. Кыдырманов,
М. Х. Саятов, К. Д. Даулбаева, Е. Я. Хан, С. А. Сулейменова

*ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», г. Алматы,
Богенбай батыра 105, Республика Казахстан*

Ye. T. Kassymbekov, K. O. Karamendin, A. I. Kydyrmanov,
M. H. Sayatov, K. D. Daulbaeva, E. Ye. Khan, S. A. Suleimenova

Аннотация

Приводятся результаты выделения шести (6434/15, 6438/15, 6440/15, 6444/15, 6446/15, 6451/15) изолятов парамиксовируса птиц серотипа-1 в Южном Казахстане.

По данным филогенетических исследований штамм ПМВ-1/сизый голубь/Чокпак/6444/15 проявлял близкое родство с европейскими вариантами и по гену белка слияния отнесен в кластер уникальных вирусов в пределах класса 1.

Abstract

The results of isolation of six isolates (6434/15, 6438/15, 6440/15, 6444/15, 6446/15, 6451/15) of avian serotype 1 paramyxovirus in South Kazakhstan are presented.

The strain APMV-1/Rock dove/Chokpak/6444/15 in phylogenetic assay of the fusion protein gene showed a close relationship to the European like variants and was prescribed to the cluster of unique viruses within the class 1.

Болезнь Ньюкасла представляет собой серьезную угрозу для птицеводства во всем мире [1]. Возбудитель болезни относится к птичьему серотипу парамиксовирусов-1 (ПМВ-1) из семейства Paramyxoviridae, рода Avulavirus [3].

Установлено, что вирусы болезни Ньюкасла (ВБН) различных линий, представляющие разные географические регионы, одновременно подвергаются эволюционным изменениям, что значительно затрудняет контроль и диагностику болезни [4, 5]. Молекулярно-генетические исследования выявили неоднородность популяций ВБН, циркулирующих в мире. В настоящее

время имеется несколько филогенетических классификаций ПМВ-1 с разделением на линии или генотипы.

Согласно классификации все изоляты ВБН разделяются на класс I и класс II [6]. Молекулярно-генетический анализ показал, что внутри генотипа I существует три субгруппы Ia, Ib и Ic.

Вирусы II группы отличаются значительной дивергентностью, филогенетический анализ выявил в ее составе десять ранее описанных генотипов и 5 новых (X, XII, XIII, XIV и XV) [7].

С середины 2000-х гг. исследования по вариабельности современных штаммов ВБН в Казахстане не проводились, в то время как ситуация по данной инфекции продолжает оставаться напряженной и представляет большой научный интерес для работников ветеринарной службы Республики.

В связи с вышеуказанным, мониторинг популяций диких птиц необходим для изучения ареала распространения и спектра известных серотипов ПМВ, выявления заносов возбудителей и их новых разновидностей, определения видового состава инфицируемых птиц.

В 2014 г. в Алматинской, Атырауской, Акмолинской и Жамбылской областях Казахстана собраны 797 биологические пробы от 604 особей, относящихся к 43 видам 19 семейств 10 различных отрядов диких птиц (из описанных в Казахстане 62 семейств и 21 отряда орнитофауны) в виде клоакальных, трахеальных смывов, кусочков органов и помета.

В ходе первичного заражения 10–11 дневных развивающихся куриных эмбрионов и двух последовательных пассажей из материалов, собранных от диких птиц в Жамбылской области (Чокпак) выделены шесть гемагглютинирующих агента (6434/15, 6438/15, 6440/15, 6444/15, 6446/15, 6451/15).

В ОТ-ПЦР проведен скрининг пулов биологических проб, собранных от диких птиц во время весеннего и осеннего перелетов, с праймерами к фрагментам консервативной последовательности L генов ПМВ, которые охватывают участки геномов в 132 и 700 п.о., соответственно. В результате реакции образцы из Западного и Центрального Казахстана показали отрицательные результаты на наличие ВБН.

В то же время скрининг в ПЦР биологических проб, собранных от беркута, сизых голубей, черноголовых хохотунов, майны и больших бакланов в Жамбылской области (орнитологическая станция «Чокпак»), позволил выявить 8 положительных проб, относящихся к семейству ПМВ-1.

Секвенированы полные нуклеотидные последовательности генов внутренних (L, P, M, NP) и поверхностных (HN, F) белков изолята ПМВ-1/сизый голубь/Чокпак/6444/15.

Установлено, что его геном состоит из 15203 п.о. Аналогично другим ПМВ-1, этот вирус содержит шесть генов в следующей последовательно-

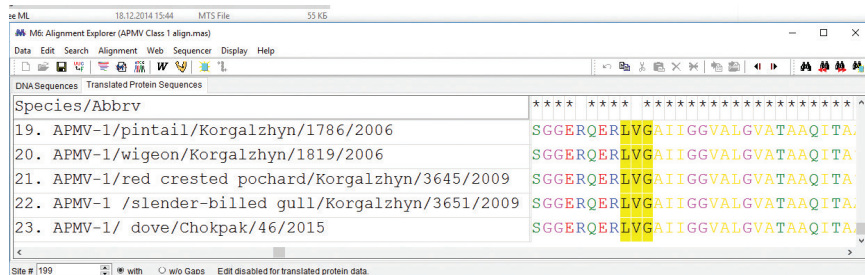
сти: NP, P, M, F, HN и L. Ген нуклеопротеидного белка (NP) представлен 1470 п.о., фосфопротеидного (P) — 1200 п.о., матричного (M) — 1095 п.о., полимеразного (L) — 6615 п.о. Гены белков F и HN состоят из 1662 п.о., и 1758 п.о., соответственно. Процентное содержание G+C вирусного генома равно 47,98 %. Концевые последовательности 5' и 3' состоят из 114 и 55 нуклеотидов соответственно. Структура стартового гена (GS) аналогична таковым других ПМВ-1 и содержит последовательность UGCCCAUCUU, которая оказывает влияние на эффективность транскрипции всех генов.

Нуклеотидная структура концевого гена (GE) содержит последовательность U/A)A(U/A)UCUUUUUU, с которой связаны процессы терминирования и инициации синтеза.

Геном вируса ПМВ-1/сизый голубь/Чокпак/6444/15, проявивший наибольшее сходство (98 %) с таковым штамма NDV08-046, выделенным в 2008 г. от утки в Китае, вошел в кластер уникальных вирусов, состоящих, в основном, из низко- или апатогенных ПМВ.

Для анализа аминокислотного состава нуклеотидной последовательности поверхностных HN и F белков казахстанских вирусов использован изолят ПМВ-1/сизый голубь/Чокпак/6444/15 от дикой птицы из Жамбылской области.

У штамма ПМВ-1, выделенного от сизого голубя на перевале Чокпак в Жамбылской области, отсутствуют множественные основные аминокислоты в сайте расщепления F-белка (ERQER), что свидетельствует о его низкой патогенности для птиц (см. рисунок).



Сайт расщепления белка слияния казахстанского изолята ПМВ-1/сизый голубь/Чокпак/6444/2015 (полевой № -APMV-1/dove/Chokpak/46/2015)

По результатам филогенетических исследований штамм ПМВ-1/сизый голубь/Чокпак/6444/15 проявлял близкое родство с европейскими вариантами и по гену белка слияния отнесен в кластер уникальных вирусов в пределах класса 1.

Литература

1. Alexander D.J, Aldous E.W, Chad M. F. The long view:A selected review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 2012; 41: 329–335.
2. Cattoli G, Susta L, Terregino C, Brown C. Newcastle disease:A Shahid and Liaquat 366 review of field recognition and current methods of laboratory detection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011; 23: 637–656.
3. Miller P., Decanini E., Afonso C. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges // *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases.* — 2010. — Vol. 10. — P. 26–35.
4. Cattoli G., Fusaro A., Monne I., Molia S, Le Menach A., Maregeya B., Nchare A., Bangana I., Maina A., Koffi J., Thiam H., Bezeid O., Salviato A., Nisi R., Terregino C., Capua I. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa-implications for diagnosis and control // *Veterinary Microbiology.* 2010. Vol. 142. P. 168–176.
5. Diel D., da Silva L., Liu H., Wang Z., Miller P., Afonso C. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes // *Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases.* — 2012. — Vol. 12. — P. 1770–1779.
6. Miller P., Estevez C., Yu Q., Suarez D., King D. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses // *Avian Diseases.* — 2009. — Vol. 53(1). — P. 39–49.

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА EP402R*

RECOMBINANT VIRUS OF AFRICAN SWINE FEVER WITH EP402R GENE

Г. С. Кольцова, И. А. Титов, А. С. Малооголовкин

*ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии
и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВМ)*

G. S. Koltsova, I. A. Titov, A. S. Malogolovkin

Federal research center for virology and microbiology

E-mail: Lila5757@yandex.ru

Аннотация

Африканская чума свиней является одним из наиболее опасных вирусных заболеваний домашних свиней. Вакцины против АЧС отсутствуют, а их разработку осложняет недостаток данных об антигенах, обуславливающих сероиммунотипovou принадлежность вируса. Ранее нами было показано, что два белка вируса АЧС, CD2v (EP402R) и C-type Lectin like protein (EP153R), являются необходимыми и достаточными для опосредования серологической специфичности в РЗГА (Malogolovkin et al., 2015). В данной работе представлены результаты изучения рекомбинантного вируса АЧС с делецией гена EP402R, включая характеристику иммуногенных свойств данного вируса. Продемонстрировано, что белок CD2v представляет собой важный протективный антиген вируса АЧС.

Abstract

African swine fever is an emerging disease threat for the swine industry worldwide. No ASF vaccine is available and progress is hindered by lack of knowledge concerning the viral antigens conferring type-specific protective immunity in pigs. Recently, we have shown that two ASFV proteins, CD2v (EP402R) and C-type lectin (EP153R), are necessary and sufficient for mediating HAI serological specificity (Malogolovkin et al., 2015). Here, we present the results of studying the recombinant ASFV with the EP402R gene deletion, including the data of vaccination/challenge experiments in pigs. We demonstrate that serotype-specific CD2v protein is important for protection against homologous ASFV infection.

© Г. С. Кольцова, И. А. Титов, А. С. Малооголовкин, 2018.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-00090).

Африканская чума свиней (АЧС) является одним из наиболее опасных вирусных заболеваний домашних свиней. Возбудитель болезни, вирус африканской чумы свиней — большой, оболочечный и сложноорганизованный ДНК-содержащий вирус из рода *Asfivirus* семейства *Asfarviridae* (Dixon L., et al., 2000).

Начиная с 2007 года, во многих субъектах Российской Федерации отмечается неблагополучная эпизоотологическая обстановка по АЧС. Вспышки АЧС были зарегистрированы и в других европейских странах (Польша, Эстония, Латвия, Литва, Чехия, Румыния, Болгария), в том числе в популяциях диких кабанов. Отсутствие вакцин затрудняет контроль распространения болезни. Инактивированные вакцины неэффективны, и только иммунизация живыми аттенуированными вирусами позволяет защитить животное от гибели после заражения гомологичными вирулентными штаммами. Однако использование вакцин на основе аттенуированных штаммов может быть опасно из-за возможной длительной персистенции вируса в организме и развития хронической формы болезни. Кроме того, многие исследователи отмечали низкий уровень или отсутствие перекрестной защиты. По результатам предыдущих многолетних исследований, проведенным в ФГБНУ ФИЦВиМ, на основании результатов реакции задержки гемадсорбции установлено наличие восьми серогрупп вируса АЧС (Середа А. Д. и Балышев В. М., 2011). Филогенетический анализ более чем 70 штаммов вируса АЧС показал корреляцию между генетическими кластерами на основе нуклеотидных последовательностей генов CD2v и C-type Lectin like protein, и выявленными ранее сероиммунотипагруппами (Malogolovkin A., et al., 2015). А изменение данных генов в геноме приводит к изменению серотиповой принадлежности штамма, что было показано в экспериментах *in vivo* и *in vitro* (Burmakina G., et al., 2016). Таким образом, было продемонстрировано, что поверхностный гликопротеин CD2v, наряду с белком C-type Lectin like protein, вероятно играет важную роль в модуляции механизмов иммунного ответа.

Целью данной работы являлось создание рекомбинантного штамма вируса АЧС с удаленным геном EP402R (Δ CongoCD2v) и изучением его биологических свойств.

Штамм Δ CongoCD2v получен из аттенуированного штамма КК-262 вируса африканской чумы свиней путем гомологичной рекомбинации. Рекомбинационная кассета представляет собой рекомбинантную плазмиду на основе вектора pUC19, содержащая фрагменты генов EP153R и EP364R (плечи рекомбинации), штамма КК-262 вируса АЧС, а также репортерный ген EGFP под контролем промотора гена p72 вируса АЧС. Рекомбинантные клоны вируса были получены при одновременной трансфекции культуры клеток COS-1 рекомбинационной кассетой и инфицировании ее вирусом АЧС

штамм КК-262. Для дальнейшего скрининга клонов использовали реакцию бляшкообразования и метод предельных разведений (7 последовательных пассажей на перевиваемой культуре клеток COS-1) и селекции мутантных вариантов вируса по репортерной флюоресценции гена EGFP. Чистота клональной популяции рекомбинантного вируса была подтверждена в ПЦР со специфическими праймерами, фланкирующими фрагмент генов EP152R и EP364R вируса АЧС, а также в ПЦР в режиме реального времени с использованием олигонуклеотидных праймеров и зондов, комплиментарных фрагментам гена EP402R (CD2v). Отсутствие нуклеотидных замен в сайте рекомбинации определяли нуклеотидным секвенированием фрагментов генома вируса.

Было продемонстрировано, что рекомбинантный штамм ΔCongoCD2v утратил гемадсорбирующую активность и, в отличие от исходного штамма КК-262, не взаимодействовал с эритроцитами свиньи после инфицирования культуры клеток макрофагов свиней. Это согласуется с данными других исследователей, согласно которым именно белок CD2v обуславливает феномен гемадсорбции вируса АЧС (Borca M., et al., 1994).

Рекомбинантный штамм ΔCongoCD2v вируса АЧС размножается в первичной культуре клеток макрофагов свиней, а также в перевиваемой культуре клеток COS-1. Кинетика репликации рекомбинантного штамма идентична исходному штамму КК-262. Репродукция вируса в культуре клеток макрофагов свиней сопровождается развитием цитопатического эффекта (ЦПЭ). Накопление вируса, как в первичной, так и перевиваемой культуре клеток составляет 6,0–7,0 lg TCD 50/см³.

Штамм ΔCongoCD2v вируса АЧС не является патогенным для свиней при внутримышечном заражении в дозе 6,0 lg TCD 50/см³. Иммунизация рекомбинантным штаммом не позволяет защитить животных от заражения вирулентным штаммом К49 вируса АЧС. Таким образом, иммуногенные свойства рекомбинантного штамма существенно отличаются от исходного штамма КК-262, иммунизация которым приводит к развитию протективного иммунного ответа против гомологичного штамма К49.

Таким образом, в ходе проведенных исследований был получен и охарактеризован рекомбинантный штамм вируса АЧС с делецией гена EP402R (CD2v). Дальнейшее его изучение позволит получить новую информацию о роли белка CD2v во взаимодействии вируса АЧС и хозяина.

**ПОИСК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
4 И 5 ГЕНОТИПОВ В КЛЕЩАХ, СНЯТЫХ С ЛЮДЕЙ
В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ В 2017 ГОДУ**

SEARCHING FOR THE 4TH AND THE 5TH GENOTYPES
OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS ISOLATED FROM TICKS
WHICH WERE TAKEN OFF FROM PEOPLE
IN NOVOSIBIRSK REGION IN 2017

Е. И. Кривошеина^{1,2}, А. И. Кузнецов^{1,2}, М. Ю. Карташов¹,
Т. П. Микрюкова¹, А. С. Акимова^{1,3}

¹ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

²Новосибирский государственный университет

³ФГБОУ ВО «Новосибирский ГАУ»

E. I. Krivosheina^{1,2}, A. I. Kuznetsov^{1,2}, M. Yu. Kartashov¹,
T. P. Mikryukova¹, A. S. Akimova^{1,3}

¹FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

²Novosibirsk State University, Russia

³FSBEI HE «Novosibirsk SAU»

Аннотация

В связи с недавним появлением публикаций о выявлении изолятов, предположительно соответствующих ранее не известным 4-му и 5-му генотипам вируса клещевого энцефалита, было проведено исследование генетического материала вируса, полученного от клещей, снятых с людей в Новосибирской области, с целью филогенетического анализа и сравнения с новыми штаммами. В исследование было взято 272 клеща, уровень инфицированности которых составил 12,5 %. Филогенетический анализ показал, что ни один положительный образец не был отнесен ни к 4 ни к 5 ни к Европейскому генотипам. Дальневосточный генотип был обнаружен у 12,9 %, а Сибирский у 87,1 % положительных проб.

Abstract

A study of ticks' infection with different genotypes of tick-born encephalitis virus in order to search supposed recently revealed the 4th and the 5th genotypes. 272 ticks were taken off from people and included to the current study. 12,5% were infected with tick-borne encephalitis virus. None of them was related to the 4th or to the 5th genotypes and also none to the European genotype. 12,9% of positive were related to the Far-Eastern and 87,1 % to the Siberian genotypes.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) является эпидемиологически значимым в РФ, он вызывает заболевание, которое затрагивает центральную нервную систему, а также может переходить в хронические формы. ВКЭ представлен несколькими генотипами каждый из которых, при попадании в организм человека может вызывать заболевания разной степени тяжести.

Принято считать, что штаммы ВКЭ делятся на три основных генотипа — Дальневосточный, Сибирский и Европейский. С развитием молекулярно-генетических методов были определены полные нуклеотидные последовательности ВКЭ, которые показали, что ВКЭ очень разнообразен и возможно обнаружение новых генотипов вируса. Так в Восточной Сибири были выявлены штамм 178–79 и штаммы группы 886, которые были описаны как 4 генотип и 5 генотип, соответственно. Поиск новых генетических вариантов ВКЭ является важной задачей для современной науки, потому что на основании таких исследований становится возможной разработка более совершенных методов диагностики инфекции и вакцинации населения.

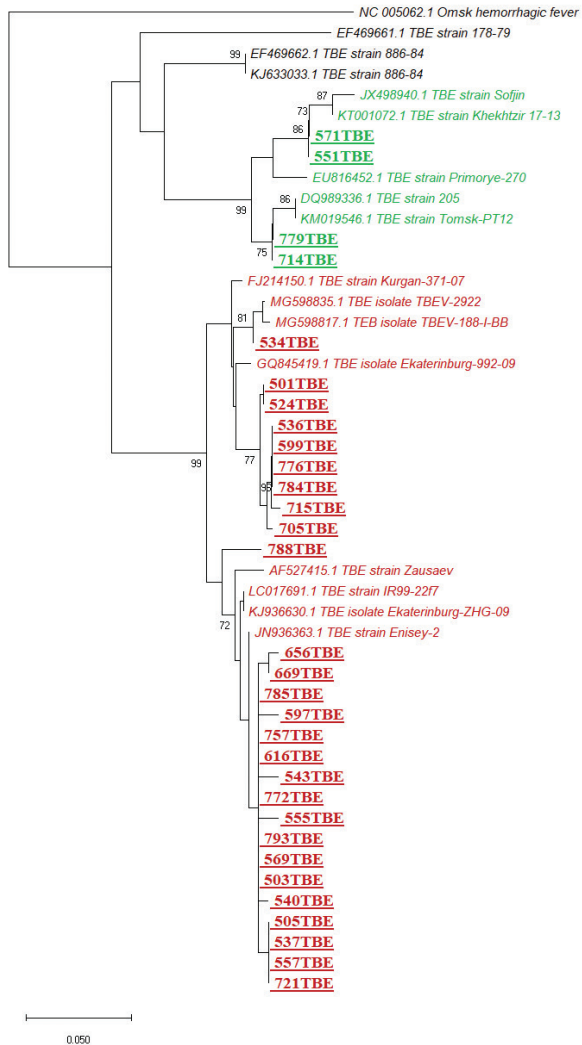
Целью работы являлся поиск возбудителей клещевого энцефалита 4 и 5 генотипов в клещах, снятых с людей в Новосибирской области.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**: создание коллекции ДНК/кДНК клещей; детекция генетического материала ВКЭ методом ПЦР; определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена E выявленных изолятов; сравнение выявленных изолятов с штаммами 4 и 5 генотипов при помощи филогенетического анализа.

Материалы и методы

Всего в исследование было взято 272 клеща родов *Ixodes* (85 шт.) и *Dermacentor* (187 шт.), которые были сняты с людей в летний период в Новосибирской области в 2017 году.

Гомогенизация клещей осуществлялась с использованием лабораторного гомогенизатора Tissue Lyser (Qiagen, Германия) в 300 мкл стерильного физраствора. Выделение нуклеиновых кислот осуществлялось сорбционным методом коммерческим набором по инструкции производителя («ИнтерЛабСервис», Россия) Реакция обратной транскрипции проводилась набором «Реверта-100» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Скрининг клещей на наличие генетического материала ВКЭ проводили с помощью метода ПЦР с использованием праймеров на фрагмент гена E генома ВКЭ. Секвенирование продуктов амплификации проводили по обоим цепям методом Сэнгера на основе капиллярного электрофореза с помощью автоматического секвенатора 3130xl Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ Unipro UGENE v.1.30 и MEGA X.



Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей гена Е вируса клещевого энцефалита. Зеленым цветом обозначены последовательности, относящиеся к Дальневосточному генотипу, а красным цветом — к Сибирскому. Полуужирным шрифтом с подчеркиванием выделены последовательности, полученные в данном исследовании, курсивом выделены прототипные последовательности

Результаты и их обсуждение

Методом ПЦР был выявлен генетический материал ВКЭ в 34 пробах. Таким образом уровень инфицированности составил $12,5 \pm 2\%$. Инфицированность ВКЭ клещей рода *Ixodes* составила $11,8 \pm 3,5\%$, а клещей рода *Dermacentor* — $12,8 \pm 2,4\%$.

Для выявленных изолятов ВКЭ были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена E, кодирующего основной антигенный белок. На основании полученных данных было построено филогенетическое дерево (см. рисунок), в структуру которого были также включены прототипные последовательности некоторых штаммов и изолятов ВКЭ из международной базы данных GenBank NCBI с целью отнесения полученных в исследовании последовательностей к соответствующим ветвям дендрограммы. Прототипная последовательность, соответствующая вирусу Омской геморрагической лихорадки представлена для сравнения в качестве близкородственного вируса.

К Дальневосточному генотипу было отнесено $12,9 \pm 6\%$, а к Сибирскому — $87,1 \pm 6\%$ положительных проб. Гомология выявленных изолятов со штаммом 178–79 была на уровне 83–87%, а со штаммами группы 886–84 — 86–91%. Следовательно, ни один из выявленных нами изолятов не относится к предполагаемым 4 и 5 генотипам. Также не было обнаружено сходства и с Европейским генотипом ВКЭ.

Большая часть образцов, отнесенных к Сибирскому генотипу, была близка к штамму Enisey-2 — 63%, меньше к изоляту Ekaterinburg-992-09 — 29,6% и по одному образцу к штамму Zausaev и изоляту TBEV-2922 — по 3,7%. Разделение 4 образцов в Дальневосточной ветви произошло поровну между штаммами Tomsk-PT12 и Khekhtzir 17-13.

Заключение

Исследование клещей, снятых с людей в Новосибирской области в 2017 году, не выявило ни одного образца, содержащего генетический материал ВКЭ, соответствующего штаммам 178-79 и 886-84, выделенным в Восточной Сибири. Возможно, предложенные генотипы на самом деле существуют, но не встречаются или очень редко встречаются на территории Западной Сибири. Подавляющее большинство инфицированных клещей ВКЭ в Западной Сибири являются переносчиками Сибирского генотипа (87,1%). В целях повышения эффективности в области эпидемиологического контроля природно-очаговых инфекций, необходимо продолжать исследование клещей на предмет нетипичных вариантов ВКЭ в Новосибирской области.

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ВИЧ-1
В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ: ГОРЯЧАЯ ТЕРРИТОРИЯ
РЕКОМБИНАЦИИ ВИРУСА***

GENETIC DIVERSITY HIV-1 IN KRASNOYARSK REGION:
A HOT AREA OF VIRAL RECOMBINATION

Л. В. Максименко¹, А. В. Тотменин¹, С. Е. Скударнов²,
С. В. Яценко², Н. М. Гашникова¹

¹ *Федеральное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Роспотребнадзора, пос. Кольцово,
Новосибирская область*

² *Краевое государственное автономное учреждение
здравоохранения «Красноярский краевой Центр профилактики
и борьбы со СПИД», г. Красноярск*

L. V. Maksimenko¹, A. V. Totmenin¹, M. P. Gashnikova¹,
S. E. Skudarnov², S. V. Yaschenko², N. M. Gashnikova¹

¹ *FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*
² *Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS,
Krasnoyarsk, Russia*

E-mail: locet@inbox.ru

Аннотация

Клинические образцы крови 157 жителей Красноярского края с диагностированной в период 2002-2017 гг ВИЧ-инфекцией, были собраны с конца 2017 до февраля 2018 г. Для каждого образца были получены и расшифрованы гены *pol* и *env* ВИЧ-1, с применением филогенетического и рекомбинационного анализов выполнено генотипирование ВИЧ-1. Первичная резистентность ВИЧ-1 была найдена у 4,5 % пациентов, не получавших антиретровирусную терапию (АРВТ). Как показал филогенетический анализ, основными генетическими циркулирующими вариантами ВИЧ являлись субтип А (56,2 %) и CRF63_02A1 (13,7 %). В 30,1 % были выявлены впервые описанные уникальные рекомбинантные формы (URFs), включающие рекомбинантные вирусы

© Л. В. Максименко, А. В. Тотменин, С. Е. Скударнов, С. В. Яценко, Н. М. Гашникова, 2018.

* Исследование разнообразия ВИЧ-1 выполнено в рамках ГЗ-2/16, анализ генетической гетерогенности и первичной резистентности области интегразы ВИЧ-1 проведен при поддержке проекта РНФ № 16-15-10238.

URF63_02A1/A6 (25,3 %), URF03_AB/A (4,1 %) и URF03_AB/A/63_02A1 (0,7 %). Интересно, что уникальные генотипы ВИЧ-1 впервые были выявлены нами в Красноярском крае после 2012 (в 2012 в 10 % случаев, в 2015 — в 52,6 %, в 2017 — в 46,2 %).

Abstract

Blood samples from a total of 157 HIV-1 persons in Krasnoyarsk region, who were diagnosed between 2002 and 2017, were collected in 2017–2018. HIV-1 pol, env genes were amplified and sequenced from plasma followed by genotype determination using phylogenetic and recombination analyses. Transmitted antiretroviral resistance mutations were observed among 4,5 % individuals, who were antiretroviral therapy (ART)-naïve. Major circulating HIV-1 genotypes determined by neighbour-joining phylogenetic inference included subtype A6 (56,2 %) and CRF63_02A1 (13,7 %). At 30.1 % were newly-described unique recombinant forms (URFs) including recombinant viruses URF63_02A1/A6 (25,3 %), URF03AB/A (4,1 %) and URF03AB/A/63_02A1 (0,7 %). Interestingly, unique HIV-1 genotypes were detected for the first time in Krasnoyarsk region after 2012 (in 2012 at 10 % of cases, in 2015 — 52,6 %, in 2017 — 46,2 %).

В отличие от территорий Центральной России и Урала, где доминирует распространение специфического российского субтипа А (А6) ВИЧ-1, в Новосибирской, Томской, Кемеровской областях, в Алтайском крае более 85 % из количества новых выявляемых случаев ВИЧ-инфекции после 2013–14 гг вызвано циркулирующей рекомбинантной формой (CRF) 63_02A1 ВИЧ-1 или рекомбинантными ВИЧ на основе CRF63_02A1 ВИЧ-1. В Красноярском крае до 2008 года регистрировалось распространение ВИЧ-1 субтипа А [1].

Учитывая недавнее возникновение CRF63_02A1 ВИЧ-1, её растущую распространенность в ряде регионов Сибирского федерального округа, представляло интерес исследование современной молекулярно-эпидемиологической ситуации в Красноярском крае.

Общее число ВИЧ-инфицированных лиц, зарегистрированных на территории Красноярского края на 01.06.2018 г. достигло 35779, показатель пораженности составил 734,6 на 100 тысяч населения. Среди территорий СФО по уровню распространенности ВИЧ-инфекции Красноярский край занимает 5 место после Кемеровской, Иркутской, Новосибирской областей и Алтайского края. За период эпидемии в крае были зарегистрированы три вспышки распространения ВИЧ-инфекции: в 2000–2002, 2007–2008 и в 2013–2014 годах. Данные эпидемиологического анализа указывают на то, что активизация ВИЧ-инфекции была связана с распространением ВИЧ в среде потребителей наркотиков (ПИН), а последняя — с вовлечением в распространение ВИЧ-1 потребителей синтетических наркотических препаратов.

Клинические образцы были собраны от 157 ВИЧ-инфицированных жителей Красноярского края в конце 2017 — начале 2018 гг. В исследование было вовлечено 51 % женщин и 49 % мужчин, средний возраст пациентов составил 38 лет (18–58). Из плазмы крови выделяли РНК ВИЧ-1 и определяли нуклеотидные последовательности генов *pol* и *env*, кодирующие белки обратной транскриптазы, протеазы, интегразы и основного белка оболочки вируса. Для расшифрованных последовательностей с применением специализированных программных ресурсов выполняли филогенетический, мутационный и рекомбинантный анализы.

Установлено, что у 18 пациентов со сроком постановки диагноза 2002–2008 гг в 100 % случаев был выявлен ВИЧ-1 субтипа А. Среди 20 человек с выявленной ВИЧ-инфекцией с 2009 по 2012 гг в 80 % был выделен ВИЧ-1 субтипа А, по 10 % пришлось на ВИЧ-1 CRF63_02A1 и URF63_02A1/A. В выборке лиц (18), диагностированных в 2013, URF ВИЧ-1 выявлялись в 30,8 %, в 2014 — выявлено 42 % URF ВИЧ-1 (8 из 19). Среди 76 пациентов, диагностированных в 2015–2017 годах, URF ВИЧ-1 были найдены в 42,1 %, субтип А вируса был выделен в 43,4 % случаев, CRF63_02A1 — в 14,5 %.

Среди всех уникальных описанных в работе URF ВИЧ-1 78,9 % являлись результатом повторного инфицирования людей вирусами субтипа А и CRF63_02A1 (URFA/63_02A1), в одном случае был описан URF ВИЧ-1, образованный при рекомбинации вирусов среднеазиатского CRF02_AG ВИЧ-1 и субтипа А (URF02_AG/A). Особый интерес вызвали семь вариантов ВИЧ-1, являющихся продуктом рекомбинации CRF03_AB и субтипа А (URF03_AB/A). Шесть из этих вирусов формировали на филогенетическом дереве отдельную ветвь с коэффициентом поддержки 99, что указывает на высокий процент их генетической идентичности и вероятность возникновения новой CRF. Седьмой вариант URF03_AB/A, выделенный от потребителя инъекционных наркотических препаратов, после углубленного исследования оказался «тройным» рекомбинантом ВИЧ-1 — URF03_AB/A/63_02A1. Анализ эпидемиологических данных позволил определить, что URF03_AB/A ВИЧ-1 выявляется в Красноярске и близлежащих населенных пунктах с 2014 года среди ПИН (3 случая) и среди лиц, инфицированных при гетеросексуальных контактах (4).

Среди лиц, вовлеченных в исследование, 134 человека не имели опыта приема антиретровирусных препаратов (АРВП), никто из лиц, получавших антиретровирусную терапию (АРВТ), не принимал ингибиторы интегразы вируса. Поэтому для исследованной выборки ВИЧ-1 мы смогли оценить распространенность первичной резистентности ВИЧ-1.

Резистентность ВИЧ-1 была найдена у 4,5 % (6 из 134) пациентов, не получавших АРВТ. Четверо из них являлись ПИН, при этом у 2-х лиц, инфици-

цированных при гетеросексуальных контактах, была выявлена резистентность более высокого уровня. Анализ генетической гетерогенности ВИЧ-1, выделенных от жителей Красноярского края, не позволил подтвердить частоту встречаемости субтип-специфичных мутаций (M50I и L74I), описанных нами для CRF63_02A1 и субтипа А ВИЧ-1 при исследовании гетерогенности вирусов на других территориях СФО. Вероятно, данный факт можно объяснить большим количеством рекомбинационных событий, регистрируемых в области генома, кодирующей интегразу вируса.

Определение родства выделенных ВИЧ-1 к клеточным рецепторам CCR5 и CXCR4, выполненное путем анализа аминокислотной последовательности области, кодирующей основной белок оболочки вируса, указывает на то, что среди ВИЧ-1 субтипа А CXCR4-тропные ВИЧ были найдены в 7,8 % случаев в большей части у лиц, имеющих более длительный период болезни, по сравнению с лицами, инфицированными CXCR4-тропными вирусами CRF63_02A1. Среди вирусов CRF63_02A1 тропность к CXCR4-ко-рецептору регистрировалась в два раза чаще (15,8 %), что является плохим прогностическим признаком для развития болезни.

Исследование современной ситуации по распространению ВИЧ-1 в Красноярском крае позволило выявить негативные изменения в эпидемическом процессе. В крае впервые зарегистрирована циркуляция генетически отличающихся ВИЧ-1, что создает условия для рекомбинационной изменчивости вируса. Впервые в России описана территория с таким уникально высоким процентом выявления возникающих новых рекомбинантных ВИЧ-1. Очевидно, что к возникновению URF ВИЧ-1 приводит практика рискованного поведения жителей края. Тем не менее, на данном этапе работ не представляется возможным объяснить высокий процент выявления возникающих новых URF ВИЧ-1 на территории Красноярского края, практически в 2 раза превышающий распространенность URF ВИЧ-1 в Кемеровской области, где пораженность населения ВИЧ намного выше.

Литература

1. Rumyantseva O. A. et. al. Epidemiological Networks and Drug Resistance of HIV Type 1 in Krasnoyarsk Region, Russia // AIDS Research and Human Retroviruses. 2009. — V. 25. — P. 931–936.

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ
ВЫСОКОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА H5NX,
ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF H5NX HIGHLY
PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUSES
OF CLADE 2.3.4.4 IN RUSSIA**

В. Ю. Марченко, Н. П. Колосова, Н. И. Гончарова,
И. М. Сулопаров, А. С. Гудымо, С. В. Святченко,
Е. В. Гаврилова, Р. А. Максютков, А. Б. Рыжиков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

V. Marchenko, N. Kolosova, N. Goncharova, I. Susloparov, A. Gudymo,
S. Svyatchenko, E. Gavrilova, R. Maksyutov, A. Ryzhikov

FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор, Russia

Аннотация

За последние два года в России складывалась неблагоприятная ситуация по гриппу птиц. Это было связано с распространением высокопатогенных вирусов клады 2.3.4.4, которые вызвали множественные вспышки среди диких и домашних птиц в Европейской части России. Также, некоторые вирусы гриппа клады 2.3.4.4 выделялись в ходе мониторинга вируса гриппа в других регионах России. Так, осенью 2016 года в ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории Камчатского края был выделен вирус гриппа субтипа А(H5N5). Затем, в течение 2016–2017 года регистрировались вспышки среди диких и домашних птиц, вызванные вирусом гриппа субтипа А(H5N8). В конце 2017 года в Костромской области была зарегистрирована вспышка среди сельскохозяйственных птиц, вызванная вирусом гриппа субтипа А(H5N2). Нами проведен сравнительный вирусологический и молекулярно-биологический анализ новых и ранее выделенных штаммов вируса гриппа птиц субтипов А(H5Nx).

Abstract

For the last two years there has been challenging situation regarding avian influenza in Russia. This was due to the spread of highly pathogenic avian influenza viruses of clade 2.3.4.4, which caused multiple outbreaks among wild birds and poultry in European part of Russia. Also several viruses of clade 2.3.4.4 were isolated during avian influenza virus surveillance in other regions of Russia. In the autumn of 2016, during the avian influenza

virus surveillance in the territory of the Kamchatka region of Russia the HPAI A(H5N5) influenza virus was isolated. Then, during 2016–2017, multiple outbreaks among wild birds and poultry caused by HPAI A(H5N8) avian influenza virus were recorded in European part of Russia. At the end of 2017, an outbreak among poultry caused by HPAI A(H5N2) influenza virus was recorded in the Kostroma region. We have selected some of these strains for the investigation and comparison of genetic and biological properties of newly and previously isolated avian influenza viruses A(H5Nx).

Результаты

При культивировании на 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах все изученные вирусы показали высокую степень вирулентности для куриных эмбрионов, приводя к их гибели в течение 48 часов после заражения. Инфекционный титр вируса в аллантоисной жидкости составил от 7,6 до 9,0 log ЭИД₅₀/ml. Показатели инфекционности вновь выделенных штаммов A(H5N8), A(H5N5) и A(H5N2) оказались сопоставимы с показателями штамма A/great crested grebe/Tyva/34/2016 (H5N8), выделенного в мае 2016 года до начала масштабной эпизоотии в России, и были выше показателей инфекционности штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), циркулировавшего ранее. Для всех штаммов было определено наличие аминокислотной последовательности REKRRKR*GL в сайте протеолитического расщепления гемагглютинина, что характерно для высокопатогенных штаммов вируса гриппа. Также, изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей Balb/c показатель инфекционной дозы (ИД₅₀) находился в диапазоне 1,6–2,8 log ЭИД₅₀. Также, для штаммов были определены значения летальной дозы (ЛД₅₀), которые составили 1,8–4,4 log ЭИД₅₀. При этом, показатели вирулентности для изученных штаммов различались в зависимости от субтипа выделенного вируса. При этом, наибольшую вирулентность для мышей показал штамм A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2). Результаты исследования антигенных свойств показали, что все изученные штаммы A(H5Nx), включая штамм A/environment/Kamchatka/18/2016 (H5N5) и A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) имеют высокую степень антигенного родства со штаммами вируса гриппа H5N8, циркулировавшими ранее в России, а также рекомендованными в 2016–2017 кандидатными вакцинными штаммами клады 2.3.4.4. Филогенетический анализ гена НА вновь выделенных в России штаммов A(H5Nx) также определил их высокую степень идентичности и принадлежность к кладе 2.3.4.4. Однако, в отличие от кандидатных вакцинных штаммов клады 2.3.4.4 2016–2017, и штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8), выделенного ранее, все они относятся к группе В вирусов гриппа клады 2.3.4.4. Изученные штаммы показывают высокую степень идентичности с кандидатными вакцинными штаммами клады 2.3.4.4, предложенными ВОЗ в 2018 году. При исследовании нуклеотидных последова-

тельностью геномов выделенных штаммов с использованием Genetic Changes Inventory и FluSurver был выявлен ряд мутаций, влияющих на антигенные свойства вирусов и его вирулентность. Анализ выделенных штаммов выявил наличие генетических маркеров (94S, 133A, 156A, 192K) в гене HA, обуславливающих потенцию для рецепторного взаимодействия с $\alpha 2$ -6 остатками сиаловых кислот. Также, в генах NS(142S, 103F, 106M), PB2 (L89V, G309D, T339K, R477G, I495V, K627E, A676T) и M30 (30D and 215A) всех выделенных штаммах выявлены маркеры, обуславливающие высокую вирулентность вирусов гриппа для мышей. В гене NS1 (205S, T47A) выделенных штаммов выявлены маркеры, обуславливающие устойчивость к противовирусным препаратам. При этом, по результатам дополнительного исследования нейраминидазной активности, все штаммы оказались чувствительны к антивирусным препаратам занамивир и озельтамивир. В гене NA штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) было выявлено наличие делеции в 24 аминокислотных остатка в области «ножки» нейраминидазы.

Заключение

С момента первого случая выделения высокопатогенного вируса гриппа кллады 2.3.4.4 в России, данный вирус продолжает циркулировать в природе, приобретая в ходе эволюции новые свойства. Это было показано проведением вирусологических и молекулярно-генетических исследований вирусов гриппа A(H5Nx), выделенных нами в различных регионах России. Результаты изучения антигенных свойств и филогенетический анализ Российских штаммов A(H5Nx) показали высокое родство с рекомендованным ВОЗ в 2018 году кандидатным вакцинным штаммом A/Fujian-Sanyuan/21099/2017-like (H5N6), что подтверждает целесообразность создания вакцины на основе данного штамма. Молекулярно-генетический анализ выделенных штаммов выявил ряд мутаций, отвечающих за их высокую вирулентность для мышей. При этом, повышенная вирулентность штамма A/chicken/Kostroma/1718/2017 (H5N2) может быть обусловлена комбинацией выявленных генетических маркеров вирулентности в генах HA, NS1, PB2, PB2-F2, а также наличием делеции в гене NA. Делеция в этом районе похожа на делецию в нейраминидазах высокопатогенных вирусов гриппа птиц A(H5N1), вызывающих гибель людей, и как показано экспериментально, увеличивающая вирулентность для мышей. Продолжающаяся циркуляция новых вирусов H5, включая вирусы A(H5N8) и A(H5N2) с высокопатогенным генотипом и фенотипом для птиц и млекопитающих, представляют серьезную угрозу для сельского хозяйства и общественного здравоохранения и подчеркивают важность постоянного мониторинга вируса гриппа и изучения его биологических характеристик для оценки риска распространения вирусов гриппа A(H5Nx).

**РЕКОМБИНАЦИОННАЯ КАССЕТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ
ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ
С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНОВ MGF110***

**RECOMBINATION CASSETTE FOR OBTAINING AFRICAN SWINE
FEVER VIRUS WITH DELETION OF MGF110 GENES**

К. А. Мима, Г. С. Кольцова, С. А. Каторкин, А. С. Малоголовкин

*ФГБНУ Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии*

К. А. Mima, G. S. Kolcova, S. A. Katorkin, A. S. Malogolovkin

FRCVM, Russia

E-mail: mima89@ya.ru

Аннотация

Получена рекомбинационная кассета pGEM/EGFP/MGF110 для делеции мультигенного семейства MGF110 вируса африканской чумы свиней. Кассета включает в себя гомологичные нуклеотидные последовательности для рекомбинации и последовательность маркерного белка EGFP с p72 промотором.

Abstract

Recombinant cassette pGEM/GFP/MGF110 was obtained for deletion of the multigenic family 110 (MGF110) from the African swine fever virus. The cassette includes homologous nucleotide sequences for recombination and a sequence of EGFP marker protein with a p72 promoter.

Африканская чума свиней (АЧС) является одной из самых опаснейших инфекционных заболеваний, влияющих на свиноводческую промышленность. Вирус АЧС может вызывать до 100 % летальности у домашних свиней. АЧС эндемична в большинстве стран Африки к югу от Сахары и на острове Сардиния. С 2007 года АЧС распространилась из Грузии в Российскую Федерацию и Восточную Европу, включая страны ЕС. Отсутствие вакцины от АЧС ограничивает контроль данного заболевания. Возбудителем АЧС является сложный двухцепочечный ДНК вирус, геном которого содержит до 167 генов (L. Dixon et. al., 2013). Интригующим аспектом является наличие

© К. А. Мима, Г. С. Кольцова, С. А. Каторкин, А. С. Малоголовкин, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00216.

в геноме вируса АЧС пяти мультигенных семейств (MGF), расположенных в левых и правых варибельных областях генома. Они называются MGF100, -110, -300, -360 и -505/530 (C. Netherton et. al., 2004). Ряд генов, экспрессируемых в локусах MGF360 и MGF530, определяет диапазон хозяина и вирулентность (J.Neilan et. al., 2002), а белки семейства MGF110 теряются при адаптации вируса к перевиваемым клеточным линиям (S. Pires et. al., 1997). Предполагается, что MGF могут иметь значение при распространении АЧС среди клещей. Клеточные функции большинства белков MGF в значительной степени неизвестны и трудно предсказуемы, поскольку белки демонстрируют ограниченную гомологию с белками хозяина. Так же может существовать аналогичная связь между экспрессией генов членов семейства MGF110, диапазоном хозяев и вирулентностью вируса АЧС. Однако, в настоящее время нет данных о прямой корреляции между количеством копий генов MGF110 и диапазоном восприимчивых хозяев или вирулентностью.

С целью изучения функций членов MGF110 было решено сконструировать рекомбинатную кассету и получить делеционный мутант вируса АЧС. В основе получения рекомбинатного вируса АЧС лежит гомологичная рекомбинация.

Для конструирования рекомбинантной плазмиды pGEM/GFP/MGF110 были подобраны специфические олигонуклеотидные праймеры кодирующие сайты рестрикции для клонирования в вектор pGEM-T Easy (Promega, США). В качестве матрицы для ПЦР использовали штамм «Волгоград 0110». Для наработки ПЦР-продуктов использовали высокоточную полимеразу с эндонуклеазной активностью Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, США). Далее ПЦР продукты очищали и обрабатывали специфическими рестриктазами, после чего повторно очищали методом этанольной преципитации и использовали для клонирования в вектор. Дополнительно для облегчения скринирования рекомбинантного вируса на место удаленного мультигенного семейства в конструкцию так же был введен маркерный ген EGFP с p72 промотором. Использование маркерного гена EGFP позволит проводить скрининг и селекцию мутантного вируса АЧС VolgogradΔMGF110 от вируса дикого типа по средством флуоресцентной микроскопии. Правильность сборки рекомбинационной кассеты подтверждалась нуклеотидным секвенированием.

В дальнейшем планируется использовать полученную рекомбинационную кассету для одновременной инфекции и трансфекции с целью проведения гомологичной рекомбинации. Гомологичная рекомбинация, скрининг и селекция рекомбинантного вируса будут проводиться на перевиваемой линии клеток COS-1.

Таким образом, получена рекомбинанная кассета для создания рекомбинантного вируса АЧС с делецией генов MGF110 и изучения их свойств.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ *

HETEROGENEITY OF THE AFRICAN SWINE VIRUS

Д. Ю. Морозова, А. Р. Иматдинов, А. Д. Середя

*ФГБНУ Федеральный исследовательский центр
вирусологии и микробиологии*

D. Y. Morozova, A. R. Imatdinov, A. D. Sereda

Federal Research Center of Virology and Microbiology, Russia

Аннотация

Представлен краткий анализ данных о гетерогенности вируса АЧС, которая проявляется в различиях между изолятами и штаммами по патотиповой вариабельности вирулентности, количественной гемадсорбции, сероиммунотипovому плюралитету, генотипическому многообразию. Сформулированы предложения по разработке единой системы классификации изолятов и штаммов вируса АЧС, и проведению исследований с кандидатными полисероиммунотипоспецифичными рекомбинантными и ДНК-вакцинами.

Abstract

A brief analysis of the data on the heterogeneity of the ASF virus is presented, which manifests itself in the differences between isolates and strains according to the pathogenicity variability of virulence, quantitative hemadsorption, seroimmunotype plurality, genotypic diversity. Proposals have been formulated to develop a unified system for the classification of isolates and strains of the ASF virus, and to conduct studies with candidate polyseroimmunotype-based specification recombinant and DNA vaccines.

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная, контагиозная, септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. Вакцины против АЧС отсутствуют. Вирус АЧС отличается чрезвычайной гетерогенностью, которая проявляется в различиях между изолятами и штаммами по патотиповой вариабельности вирулентности, количественной гемадсорбции, сероиммунотипovому плюралитету, генотипическому многообразию [1].

Патотиповая вариабельность вирулентности проявляется в том, что в зависимости от свойств изолятов и штаммов вируса АЧС, способа и дозы за-

ражения болезнь может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно.

Сравнительное исследование феномена гемадсорбции, проведенное с использованием различных штаммов вируса АЧС, показало их существенные отличия по признакам количественной гемадсорбции и структуре вирусных популяций в коррелятивной связи с вирулентностью. Установлено, что состав популяции каждого штамма гетерогенный, т. е. при микроскопическом наблюдении в зараженной ими культуре клеток лейкоцитов свиней встречаются «плотная», «промежуточная», «рыхлая» гемадсорбция, причем, в различных их пропорциях. На основании исследования штаммов вируса АЧС с различными биологическими характеристиками был сформирован своеобразный «градиент» по степени вирулентности и гемадсорбирующей активности. Атенуированные (авирулентные) штаммы вируса АЧС характеризовались присутствием только субпопуляций, имеющих «рыхлый» и «промежуточный» типы гемадсорбции. Вирулентные — содержали только субпопуляции вируса с «промежуточным» и «плотным» типами гемадсорбции. Таким образом, количественная характеристика гемадсорбирующей активности может рассматриваться как важный фенотипический признак изолятов, штаммов, вариантов вируса АЧС [1].

Используя реакцию задержки гемадсорбции (РЗГАд) и иммунологическую пробу на животных, Malmquist W. (1963) доказал существование семи иммунологических и серологических типов изолятов, выделенных в Африке [2]. Отечественные исследователи подтвердили, что результаты иммунологической типизации вируса АЧС заражением свиней, предварительно «вакцинированных» аттенуированными штаммами (биопроба), как правило, совпадают с их серотиповой характеристикой в РЗГАд. Около 100 «африканских», «европейских», «южноамериканских» штаммов и изолятов вируса АЧС по данным сероиммунотипизации были разделены на 12 групп [3].

Обоснованность сероиммунотипой классификации вируса АЧС подтверждена идентификацией серотипоспецифического мажорного гликопротеина gp110-140 вируса АЧС [4]. Испанскими исследователями в ходе изучения генома вируса АЧС идентифицирована открытая рамка считывания (ORF) ER402R, которая кодирует полипептид CD2v из 402 оснований, гомологичный адгезивному рецептору Т-клеток CD2. Делеция ER402R не влияла на скорость вирусного размножения *in vitro*, но лишала вирус способности индуцировать адсорбцию свиных эритроцитов на поверхности инфицированных клеток. Экспрессируемый рекомбинантным бакуловирусом продукт гена ER402R вызывал адсорбцию свиных эритроцитов в зараженных им клетках насекомых. Эти результаты свидетельствуют, что белок, кодируемый геном ER402R, прямо вовлечен в феномен гемадсорбции при инфици-

ровании чувствительных клеток вирусом АЧС. На основании совпадения физико-химических свойств gp110-140 и CD2v сделан вывод, что испанские и российские исследователи имели дело с одним и тем же гликопротеином.

Действующая и широко признанная классификация изолятов и штаммов вируса АЧС основана на методе генотипирования по секвенированию 478-нуклеотидного фрагмента из С-терминальной части гена B646L, кодирующего структурный белок р72 [5]. Проанализировав полученные в разное время десятки изолятов, отличных по географическому происхождению и организму-хозяину, удалось выделить 23 основных генотипа вируса АЧС. Самый крупный генотип включал изоляты, выделенные во время вспышек болезни в Европе, Южной Америке, Западной Африке, странах Карибского бассейна. Позднее были проведены исследования, которые позволили дополнительно дифференцировать изоляты внутри одного генотипа вируса АЧС. Был предложен центральный вариабельный участок внутри открытой рамки считывания гена 9RL. Например, внутри I генотипа было выявлено 12 различных вариантов длины амплифицированных фрагментов центрального вариабельного участка, четыре из которых соответствовали изолятам из Западной Африки, а восемь — изолятам из тех стран, где заболевание являлось экзотическим, т. е. Южной Америки, Европы, Карибского бассейна. На основе анализа нуклеотидной последовательности фрагмента другого гена, B602L, 66 изолятов, относящихся к I генотипу, были разделены на 19 подгрупп [6]. Изоляты вируса АЧС, выделенные с 2007 г. по настоящее время в Европе и Азии, отнесены ко II генотипу. Сравнение нуклеотидной последовательности генома изолята Georgia 2007/1 с другими изолятами вируса АЧС показало, что он наиболее близок с африканским изолятом Mkuzi 1979, выделенным от клещей в Зулулэнде (ЮАР). Однако, филогенетический анализ конкатенированных белковых последовательностей из 125 консервативных ORF приводит к кластеризации изолятов Georgia 2007/1 и Mkuzi 1979 с изолятами генотипа I. Таким образом, анализ филогении отдельных белков не всегда соответствует кластеризации, наблюдаемой при сравнении конкатенированных консервативных ORF. Полный анализ последовательности геномов дает более точную оценку филогенетических отношений по сравнению с анализом по одной ORF, такой как B646L [6].

Ранее упоминалось, что белок gp 110-140 (он же CD2v) обладает свойством серотиповой специфичности. Malogolovkin et al. (2014) установили, что филогенетическое древо, построенное на основании анализа генов белков вируса АЧС CD2v и лектина С-типа, соответствует дифференциации изолятов и штаммов по сероиммунотипам [7].

Исходя из вышеизложенного, предлагается разработать единую систему классификации изолятов и штаммов вируса АЧС на основе его антигенных

свойств, что потребует международной кооперации в определении референс-штаммов и стандартизации методик сероиммунотипизации. Представляется целесообразным экспериментально подтвердить возможность определения сероиммунотипов изолятов вируса АЧС по гену CD2v-белка, и начать исследования по созданию экспериментальных полисероиммуно-типоспецифичных рекомбинантных и ДНК-вакцин против вируса АЧС.

В данный момент нами проводится работа по изучению роли белка CD2v (gp 110-140) в формировании иммунной защиты против АЧС, предполагающая конструирование рекомбинантного вируса АЧС, в составе генома которого будут введены нуклеотидные последовательности этого белка от различающихся по сероиммунотиповой специфичности аттенуированных штаммов МК-200 и ФК-32/135 (III и IV сероиммунотип, соответственно). Получены активные в РЗГАд антитела свиней к вирусу АЧС III и IV сероиммунотипов. В качестве локуса гомологичной рекомбинации предложен ген вирусной тимидинкиназы (K196R). В результате анализа имеющихся в GenBank полногеномных последовательностей вируса АЧС IV сероиммунотипа и последовательностей гена EP402R подобраны олигонуклеотидные праймеры с введением искусственных сайтов эндонуклеаз рестрикции для сборки кассеты интеграции.

Литература

1. Макаров В. В. Иммунологическая концепция африканской чумы свиней (некоторые итоги исследований). Ветеринарная практика, 2013, 62(3): 7–22.
2. Malmquist W. A. Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1963, 24: 450–459.
3. Серeda А. Д., Балышев В. М. Антигенное разнообразие вируса АЧС. Вопросы вирусологии, 2011, 4: 38–42.
4. Серeda А. Д., Казакова А. С., Иматдинов А. Р., Колбасов Д. В. Гуморальные и клеточно-опосредованные механизмы иммунитета при африканской чуме свиней. Сельскохозяйственная биология, 2015, 50(6): 709–718.
5. Bastos A. D. S., Penrith M.-L., Crucièrè C., Edrich J. L., Hutchings G., Roger F., Couacy-Hymann E., Thomson G. R. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial *p72* gene characterization. *Arch. Virol.*, 2003, 148: 693–706.
6. Chapman D. A. G., Darby A. C., Da Silva M., Upton C., Radford A. D., Dixon L. K. Genomic analysis of highly virulent isolate of African swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, 17(4): 599–605.
7. Malogolovkin A., Burmakina G., Titov I., Sereda A., Gogin A., Baryshnikova E., Kolbasov D. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, 21(2): 312–315.

ПРОИЗВОДНЫЕ 2-ТИОУРАЦИЛА — ИНГИБИТОРЫ РЕПЛИКАЦИИ АДЕНОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА *

2-THIOURACIL DERIVATIVES DOWNREGULATE HUMAN ADENOVIRUS REPLICATION

Н. А. Никитенко¹, А. Н. Гейсман², В. Е. Мельникова¹, К. Н. Лысенко²,
А. И. Тухватулин¹, А. А. Озеров², М. С. Новиков², Д. Ю. Логунов¹

¹ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный
медицинский университет»

N.A. Nikitenko¹, A.N. Geisman², V.E. Melnikova¹, K.N. Lysenko²,
A.I. Tukhvatulin¹, A.A. Ozerov², M.S. Novikov², D.Y. Logunov¹

¹Gamaleya National Research Center for Epidemiology
and Microbiology, Russia

²Volgograd State Medical University, Russia

E-mail: nanthalia@gmail.com

Аннотация

Аденовирусы человека вызывают инфекционные заболевания дыхательных путей, глаз, желудочно-кишечного тракта, мочевой и нервной систем. В настоящее время методы лечения аденовирусных инфекций ограничены симптоматической и поддерживающей терапией. Целью данной работы являлось исследование ингибиторной активности синтезированных нами новых производных 2-тиоурацила в отношении аденовирусов человека. Было показано, что производные 2-тиоурацила ингибируют репликацию аденовирусов в микромолярном диапазоне концентраций, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных лекарственных средств для лечения заболеваний, вызываемых аденовирусами.

Abstract

Human adenoviruses are a group of viruses that can cause the infections of the respiratory tract, eyes, intestines, urinary tract, and nervous system. Currently, specific therapy for

© Н. А. Никитенко, А. Н. Гейсман, В. Е. Мельникова, К. Н. Лысенко, А. И. Тухватулин, А. А. Озеров, М. С. Новиков, Д. Ю. Логунов, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (МК-1746.2017.7).

adenovirus infection, other than supportive and symptomatic treatment, is not available. Therefore, we propose here to assess the anti-adenoviral activity of newly synthesized thiouracil derivatives. We have shown that 2-thiouracil derivatives inhibit adenoviral replication in the low micromolar range and thus can be considered for the development of drug candidate to treat adenovirus infections.

Аденовирусы человека (HAdV) — безоболочечные вирусы, геном которых представлен линейной несегментированной двухцепочечной ДНК. Для аденовирусных инфекций характерен широкий спектр распространения и высокая контагиозность. Заболеваемости ими подвержены люди всех возрастных групп. Аденовирусы человека чаще всего поражают различные участки слизистой, включая ткани глаз, дыхательные и мочеполовые пути, а также желудочно-кишечный тракт. Особую опасность аденовирусные инфекции представляют для пациентов с нарушениями иммунной системы: в этих случаях аденовирусы могут вызывать развитие острых инфекционных заболеваний, приводящих к летальному исходу. Существующие подходы к лечению заболеваний, вызываемых аденовирусами, ограничены симптоматической и поддерживающей терапией.

Таким образом, целью настоящего исследования является разработка, синтез новых 2-тио производных урацила и исследование их противоаденовирусной активности.

На первом этапе работы был осуществлен синтез библиотеки 2-тио производных урацила. Было выявлено, что часть полученных соединений обладает ингибиторной активностью в отношении HAdV. В результате изучения закономерностей структура-противовирусная активность была определена стратегия оптимизации структуры соединений, а также методы их синтеза. На втором этапе скрининга была исследована активность оптимизированных производных 2-тиоурацила.

Ингибиторное действие соединений оценивали по определению количества копий генома HAdV5. Вначале клетки линии НЕК293 заражали HAdV5 с множественностью инфекции 1 БОЕ/клетку. Через 3 ч после заражения к клеткам добавляли соединения в концентрациях 0,5, 2,5, 5, 10, 15 и 25 мкМ. ПЦР для определения количества копий генома HAdV 5 проводили через 24ч. Цитотоксичность оценивали с помощью метода прижизненного окрашивания данных клеток бромидом 3-[4,5-диметилтиазол-лил-2]-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) через 48 ч после внесения веществ.

В результате были определены два соединения-лидера z556 и z557, обладающих выраженным противовирусным действием и не оказывающим токсического действия на клетки линии НЕК293. Концентрация полумаксимального ингибирования составляла 0,06 мкМ и 0,33 мкМ для z556 и z557 со-

ответственно. Полумаксимальная цитотоксическая концентрация составляла 405,7 мкМ и 172,7 мкМ, а индекс селективности 6761,7 и 523,3 для z556 и z557 соответственно.

Таким образом, были выявлены ингибиторы репликации HAdV, являющиеся потенциальными лекарственными средствами для борьбы с аденовирусными инфекциями.

**РЕЦЕПТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИРУСОВ
ГРИППА А/Н3N2 И А/Н9N2, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
В 2017–2018 ГГ. В РОССИИ**

RECEPTOR SPECIFICITY OF INFLUENZA VIRUSES
A/H3N2 AND A/H9N2 CIRCULATED IN 2017–2018 IN RUSSIA

Г. С. Онхонова, В. Ю. Марченко, С. В. Святченко, А. Б. Рыжиков

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

G. S. Onkhonova, V. Yu. Marchenko, S. V. Svyatchenko, A. B. Ryzhikov

FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

E-mail: onhonova_gs@vector.nsc.ru

Аннотация

Целью данного исследования являлась оценка рецепторной специфичности изолятов вирусов гриппа типа А, выделенных и охарактеризованных в 2017–2018 гг. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. В работе представлены результаты измерений констант диссоциации с помощью кинетического метода ИФА для двух актуальных штаммов — A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 и A/swine/Irkutsk/155/2017. В работе также приведены некоторые результаты, полученные с помощью поверхностного плазмонного резонанса, позволяющие оценить возможность применения метода для оценки рецепторной специфичности вирусов гриппа.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the receptor specificity of influenza A viruses isolated and characterized in 2017–2018 at SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor. The results of dissociation constants measurements using the kinetic ELISA method for the two actual strains — A/chicken/Primorsky Krai/03/2018 and A/swine/Irkutsk/155/2017 are presented. The results of research using the surface plasmon resonance enabling to evaluate the opportunity of application of this method to analyze the influenza virus receptor specificity are also presented.

Подтип А/Н3N2 вируса свиного гриппа циркулирует по всему миру среди домашних свиней, однако может инфицировать птиц, людей и другие виды. В большинстве случаев заболевания у людей процесс инфицирования происходит в непосредственной близости от зараженных свиней или при посещении мест, где они находятся. Штамм вируса гриппа А/Н9N2 относится к птичьим подтипам и является наиболее распространенным подтипом вируса

гриппа у птиц в Китае, следовательно, приводит к большим экономическим потерям для птицеводческой отрасли. Зарегистрированы единичные случаи заражения людей данным подтипом при контакте с инфицированной птицей.

Для оценки специфичности с аналогами рецепторов на поверхности чувствительных клеток, и, как следствие, рисков инфицирования человека выбранными штаммами вируса гриппа, были проведены измерения с помощью кинетического метода ИФА. Известно, что птичьи штаммы вируса гриппа в качестве рецепторов используют сиаловые кислоты со связью $\alpha 2-3$. Такого рода рецепторы содержатся на эпителии желудочно-кишечного тракта птиц. Человеческие штаммы вируса гриппа предпочитают связываться с рецепторами со связью $\alpha 2-6$, которые находятся на клетках эпителия верхних дыхательных путей человека. На эпителии трахеи свиньи присутствуют оба типа рецепторов, поэтому помимо свиного гриппа, они могут быть инфицированы как штаммами птичьего гриппа, так и человеческого. Так как эпителий нижних дыхательных путей человека содержит также некоторое количество $\alpha 2-3$ связанных сиаловых кислот, существует риск заражения человека птичьими и свиными штаммами. Как правило, это сопровождается различного рода осложнениями, вплоть до летального исхода. Поэтому очень важно своевременно выявлять потенциально опасные для человека штаммы.

Образцы вируса гриппа были наработаны на растущих куриных эмбрионах и инаktivированы β -пропиолактоном. Для эксперимента вирус очищали путем центрифугирования и гель-фильтрации. В качестве клеточных рецепторов были выбраны сиалозиды 3'-Sialyl-N-acetylactosamine и 6'-Sialyl-N-acetylactosamine, содержащие необходимые сиаловые кислоты.

Параметром, характеризующим рецепторную специфичность, является равновесная константа диссоциации, которая рассчитывалась по следующей формуле:

$$K_d = \frac{k_-}{k_+}, \quad (1)$$

где k_- и k_+ определяются как коэффициенты уравнения прямой:

$$k = k_+ [L_0] + k_- \quad (2)$$

полученной из выражения для равновесной концентрации комплекса лиганд-рецептор:

$$[LR] = \frac{[R]_0 [L]_0}{K_d + [L]_0} (1 - e^{-t(k_+[L_0] + k_-)}), \quad (3)$$

где $[LR]$ — концентрация комплексов лиганд-рецептор, $[R]_0$ — общая концентрация рецепторов, $[L]_0$ — общая концентрация лигандов, k_+ — констан-

та скорости прямой реакции, k_- — константа скорости обратной реакции, t — время.

По результатам измерений выбранные штаммы вируса гриппа А показали более высокое связывание с аналогами рецепторов «птичьего» типа (см. таблицу). Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют предполагать, что выделенные изоляты вирусов гриппа, циркулирующих в России в 2017–2018 гг., не приобрели способности к устойчивой передаче от птиц и свиней человеку.

Равновесные константы диссоциации (K_d) для штаммов вируса гриппа A/chicken/Primorsky Krai/03/2018, A/swine/Irkutsk/155/2017, (μM)

Вирус	3'SLN	6'SLN
A/chicken/Primorsky Krai/03/2018	$1,6 \pm 1,1$	$17,5 \pm 9,6$
A/swine/Irkutsk/155/2017	$37,2 \pm 19,0$	>300

Отдельной частью исследования был анализ рецепторной специфичности с помощью SPR-диагностики. Этот метод основан на явлении поверхностного плазмонного резонанса, которое происходит, когда свет под определенным углом отражается от тонкой металлической пленки в условиях полного внутреннего отражения (ПВО). Свет возбуждает поверхностные плазмоны в металле под определенным углом падения. Поле ПВО генерирует затухающую волну, которая распространяется по всей среде. Возбужденные плазмоны очень чувствительны к изменениям показателя преломления на поверхности тонкой металлической пленки, на которой происходит связывание анализита и лиганда. Процесс можно наблюдать в реальном времени по так называемой сенсограмме. Измерения проводились на приборе ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories).

На рис. 1 представлены кинетические кривые процесса комплексообразования вирионов гриппа A/Anhui/01/2013 (H7N9) с белком фетуином, содержащим оба типа рецепторов. Как видно из графика уровень сигнала ниже, чем у буферного раствора.

В качестве другой модели лиганд-рецепторного связывания использовали сплит-вакцину Ваксигрип, которая не содержит вирусных частиц, а состоит из очищенных молекул гемагглютинина трех штаммов вируса гриппа. В этом случае кинетические кривые связывания гемагглютинина с белком фетуином адекватно описывают процессы ассоциации и диссоциации (рис. 2). Равновесная константа диссоциации в данном случае $K_d = 1,5 \pm 0,2$ нМ.

Проведенные исследования показали, что для изучения лиганд-рецепторного взаимодействия новых вирусов гриппа необходимо проводить дополни-

тельную подготовку образцов вируса гриппа для выделения и очистки молекул гемагглютинина, несущих рецепторсвязывающий участок. Использование цельных вирионов при измерении лиганд-рецепторного взаимодействия возможно при изучении кинетики процесса методом ИФА, но не с помощью SPR.

Полученные результаты по измерению равновесных констант диссоциации сиаозидов 3'SLN и 6'SLN и вирионов вируса гриппа птиц A/chicken/PrimorskyKrai/03/2018 (H9N2) и вируса гриппа свиней A/swine/Irkutsk/155/2017 (H3N2) позволяют сделать вывод о доминирующей специфичности этих вирусов гриппа животных по отношению к «птичьему» типу сиаловых рецепторов 3'SLN.

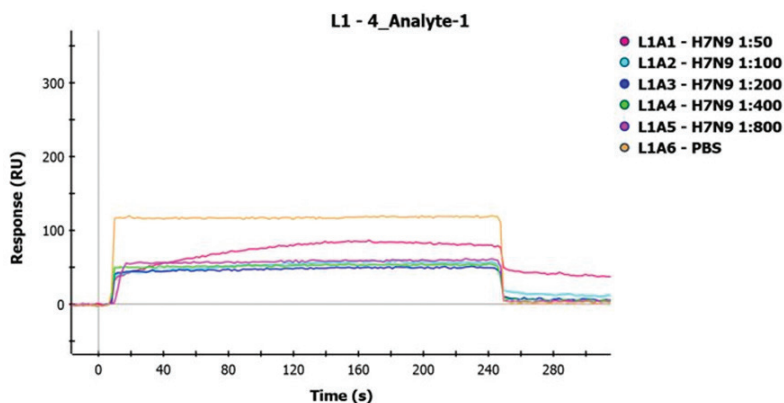


Рис. 1. Кинетические кривые процессов ассоциации и диссоциации вируса гриппа с аналогами рецепторов

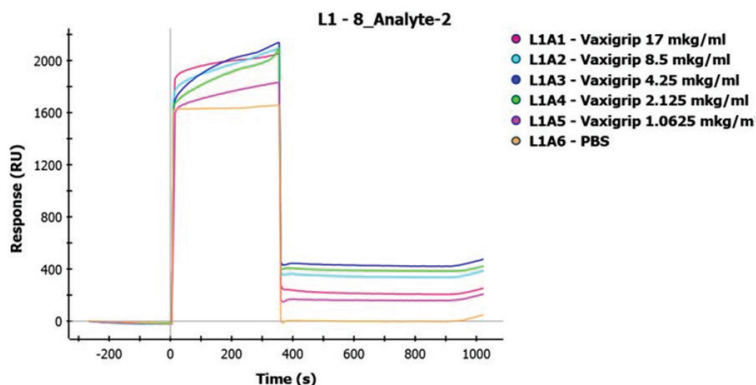


Рис. 2. Кинетические кривые процессов ассоциации и диссоциации Ваксигрипа с аналогами рецепторов

**ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ
ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ЦИРКУЛИРОВАВШИХ
В РОССИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2017–2018 ГГ. ***

ANTIGENIC AND ISOLATING PROPERTIES OF THE RECENT HUMAN
INFLUENZA A(H3N2) VIRUSES IN RUSSIAN FEDERATION
IN THE EPIDEMIC SEASON 2017–2018

П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, Д. М. Даниленко,
А. Д. Васильева, М. Ю. Еропкин

ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России

E-mail: suddenkovapolina@gmail.com

Аннотация

Вирусы гриппа в настоящее время остаются одними из самых распространенных и неуправляемыми инфекциями. Вирусы гриппа А(Н3N2) человека имеют наибольшую скорость эволюционной изменчивости. Антигенный анализ вирусов гриппа данного подтипа позволяет выбрать вакцинный компонент на предстоящий эпидемический сезон.

Abstract

Influenza viruses nowadays are still of great economic and social threat. Influenza A(H3N2) viruses has the highest rate of evolutionary variability. Antigenic analysis of influenza virus use for selection of candidate vaccine viruses for the production of influenza vaccine for the upcoming epidemic season.

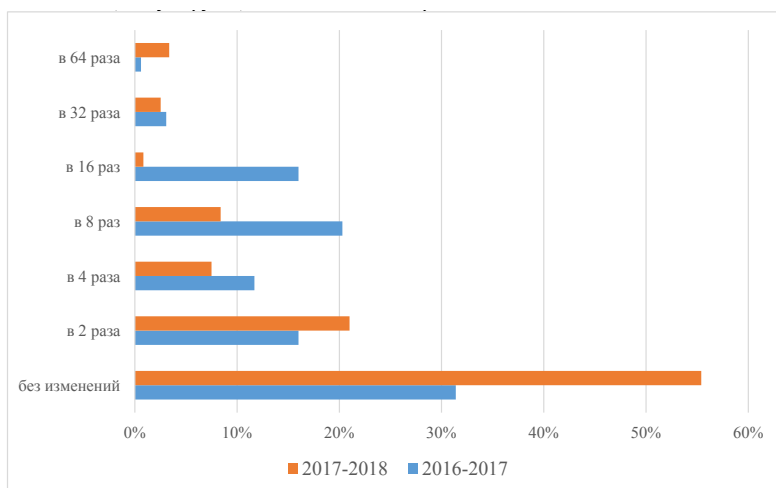
Вирусы гриппа А(Н3N2) ежегодно являются одними из основных инфекционных агентов сезонных эпидемий гриппа и приводят к тяжелым случаям заболевания с развитием большого количества осложнений у лиц, относящихся к группам высокого риска. Несмотря на значительные успехи в разработке противовирусных химиопрепаратов, основным инструментом контроля над гриппозными эпидемиями остается вакцинация. Вирусы гриппа А(Н3N2) отличаются самым высоким уровнем антигенной изменчивости, и демонстрируют высокую гетерогенность циркулирующих штаммов. Своевременное выявление антигенно новых вариантов является важной и актуальной задачей в надзоре за гриппозной инфекцией. За последнее время у представителей

© П. А. Петрова, Н. И. Коновалова, Д. М. Даниленко, А. Д. Васильева, М. Ю. Еропкин, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018).

данного подтипа вирусов гриппа человека произошли изменения рецепторных свойств, что осложнило выделение и дальнейший антигенный и генетический анализы. Многие исследователи отмечают, что вирусы, выделенные на клетках MDCK, несут аминокислотные замены в 148 или 151 положении в поверхностном белке нейраминидазе, что может оказывать влияние на их антигенные свойства. Для объективной оценки изменчивости этих вирусов ВОЗ рекомендует осуществить переход с клеточной культуры MDCK на MDCK-Siat1 в лабораторном использовании при исследовании вирусов гриппа A(H3N2). Клетки MDCK-Siat1 экспрессируют повышенное количество $\alpha 2,6$ -рецепторов, что теоретически должно существенно повысить эффективность выделения вирусов гриппа данного подтипа. Однако, ведение данной культуры на практике оказывается существенно более дорогостоящим, чем MDCK, из-за необходимости использования селективного антибиотика Генитицина. Также многие вирусы, выделенные на данной клеточной линии, не имеют гемагглютинирующего титра, но вызывают значительный цитопатический эффект. Свойства данных изолятов невозможно оценить стандартными методами и для них используется более трудоемкий метод — реакция микронейтрализации.

Для оценки антигенных свойств вирусов гриппа A(H3N2) производили параллельное выделение штаммов из назофарингиальных мазков на клеточных культурах MDCK и MDCK-Siat1 (полученной из СЦ ВОЗ в Лондоне, Великобритания). Далее проводили идентификацию вирусов гриппа и их антигенный анализ в реакции торможения гемагглютинации с панелью ди-



Зависимость падения гемагглютинирующего титра в РГА вирусов A(H3N2) от присутствия 20 нМ озельтамивира карбоксилата

агностических антисывороток, предоставляемых ВОЗ для идентификации вирусов гриппа человека и панелью крысиных антисывороток, полученных к широкому спектру современных вирусов гриппа человека A(H3N2). Перед проведением антигенного анализа в РТГА ставили реакцию гемагглютинации в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата, в результате чего производили отбор штаммов, имеющих подходящий титр для проведения РТГА. Штаммы, которые имели пониженный титр гемагглютинации анализировали с помощью реакции микронеutralизации.

В эпидемическом сезоне 2017–2018 гг. для выделения вирусов гриппа данного подтипа было взято 75 проб. На клеточной культуре MDCK было выделено 54 изолята, на MDCK-Siat1 60 изолятов.

При последующей постановке РГА в присутствии 20 нМ озельтамивира карбоксилата было показано, что у 55,4 % штаммов 2017–2018 гг. выделения титр оставался без изменений, в то время как в 2016–2017 эпидемическом сезоне таким титром обладали только 31,4 % штаммов. Большинство штаммов 2016–2017 эпидемического сезона — 88,6 %, не сохраняли свой титр в присутствии ингибитора нейраминидазы — озельтамивира в буфере. В прошедшем эпидемическом сезоне титр уменьшался у 44,6 % штаммов. Падение титра наблюдалась как у штаммов, выделенных на клеточной культуре MDCK-Siat1, так у вирусов, выделенных и пассированных на MDCK.

Таким образом, можно сделать вывод, что антигенный анализ большинства выделенных штаммов стандартными методами затруднен.

Вирусы, выделенные на разных клеточных культурах, показали сходные результаты в РТГА и микронеutralизации. По результатам антигенного анализа, вирусов A(H3N2) эпидемического сезона 2017–2018 гг. было выявлено, что большинство штаммов относятся к антигенной группе современного референс-штамма A/Сингапур/INFIMH-16-0019/16, реагируя с антисывороткой к данному вирусу до 1-1/2 гомологичного титра. Также изоляты взаимодействуют до 1-1/4 с антисывороткой к штамму, рекомендованному для вхождения в состав противогриппозных вакцин — A/Гонконг/4801/14. Однако, в настоящее время антигенно различить штаммы, входящие в различные подгруппы генетического клайда 3с.2а практически невозможно.

Подводя итог, хочется отметить, что антигенный анализ позволяет подробно и четко охарактеризовать свойства и эволюционную изменчивость вирусов гриппа. Эти данные помогают наглядно оценить антигенное соответствие циркулирующих в популяции штаммов с вирусами-кандидатами, включенными в состав противогриппозных вакцин на эпидемический сезон. Более полное и детальное исследование свойств вирусов A(H3N2) позволит повысить качество отбора штаммов-кандидатов для противогриппозных вакцин.

**РАЗРАБОТКА СПЕЦИФИЧНЫХ РЕАЛ-ТАЙМ ПЦР
ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СЕРОТИПА
ВИРУСА ЯЩУРА ASIA1**

**DEVELOPMENT OF TAILORED SPECIFIC REAL-TIME PCR ASSAYS
FOR DETECTION OF FMDV SEROTYPE ASIA1**

М. А. Садуакасова¹, А. А. Султанов¹, К. Б. Банковска²

¹ *ТОО «Казахский научно-исследовательский
ветеринарный институт»*

² *Пирбрайт Институт*

М. А. Saduakassova, А. А. Sultanov, “KazSRVI” LLP, Kazakhstan
К. В. Bankowska, The Pirbright Institute, United Kingdom

E-mail: sadumeru_87@mail.ru

Аннотация

Ящур эндемичен на большей части Азии и Западной Евразии, где вспышки очага из-за циркулирующего серотипа Asia 1 регулярно сообщаются у домашнего скота. Из них в Казахстане ранее были обнаружены серотипы О (линии ME-SA/PanAsia и ME-SA/PanAsia-2) и А (линии ASIA/Iran-05 и ASIA/Sea-97). Тем не менее, все еще есть пробелы в понимании передвижении вируса ящура. Вирус ящура является эндемичным заболеванием во многих странах близлежащих с Казахстаном, которые известны своей быстрой и непредсказуемой экспансией в новые географические регионы. Поэтому в дополнение к штаммам вируса ящура, ранее описанным в Казахстане, Asia1/ASIA/Sindh-08 генетическую линию также следует рассматривать как угрозу для сельскохозяйственной отрасли Казахстана. С целью облегчения идентификации генетической линии Sindh-08 разработана ОТ-ПЦР тест-система, определяющая специфичную генетическую линию Asia1.

Abstract

FMD is endemic across much of Asia and West Eurasia where field outbreaks due to co-circulating serotypes O, A and Asia 1 are regularly reported in domesticated livestock. Of these, serotypes O (ME-SA/PanAsia and ME-SA/PanAsia-2 lineages) and A (ASIA/Iran-05 and ASIA/Sea-97 lineages) have been previously detected in Kazakhstan. However, there are still gaps in the understanding of virus movements. The FMD viruses currently circulating in countries in the neighbourhood of Kazakhstan are known for their rapid and unpredictable expansion into new geographical areas. Therefore, in addition to the FMDV strains previously reported in Kazakhstan the Asia1/ASIA/Sindh-08 additional viral lin-

eage should be considered as a threat to Kazakhstan's agricultural industry. To facilitate identification of Sindh-08 lineage a real-time RT-PCR assay detecting a specific FMDV lineage of Asia1 was designed and validated.

The causative agent of foot and mouth disease belongs to the genus Aphthovirus, family Picornaviridae in the taxonomy of viruses. It has 7 typical variants: A, O, Asia-1, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3. Animals, infected by one serotype of foot-and-mouth disease virus, can be affected again with another type variant of the virus. Therefore, each serotype of foot-and-mouth disease must be considered as a separate noso unit and take appropriate preventive and combat measures. In addition, for each serotype of foot and mouth disease virus, during the circulation in nature (reproduction in the body of various species of animals and animals with different specific and nonspecific immune status), lineage appears that differ significantly and insignificantly in antigenic and genetic relationship.

VP1 sequence data, including historical and current strains of FMDV, were aligned, analysed and conserved regions were identified as targets for individual lineage-specific assay. Multiple primers and probes for each of the assays were designed according to TaqMan specification and tested for diagnostic sensitivity and performance. Best assay candidates were selected and validated with a panel of field samples at the Pirbright Institute, UK and the Kazakh Scientific-Research Institute, Kazakhstan.

Sindh-08 lineage-specific RT-PCR assay for detection of FMDV strains circulating in Asia were designed; to detect FMDV the Asia1/ASIA/Sindh-08 lineage. This assay was shown to correctly identify FMDV lineage in a panel of field and tissue cultured samples originated from Asia. Mixed serotype samples could also be identified using the system. In addition, FMDV positive samples which could not be propagated in tissue culture were investigated and, in many cases, the serotype of the samples could be determined. The assay developed have been shown to be of a similar efficiency to the "gold standard" 3D assay (Callahan et al., 2002).

Real-time RT-PCR assay was developed able to determine the serotype Asia1/ASIA/Sindh-08 of FMD virus circulating in Asia. This assay can aid molecular epidemiology of FMDV and help to inform FMDV control policy in the region. The system could be also adapted to field diagnostic platforms aiding transfer of technology and use in the countries concerned.

Accurate and timely diagnosis of FMD using laboratory tests provides vital support to surveillance and disease control programmes. Molecular assays such as real-time RT-PCR are now established as front-line tests, and are widely used for routine diagnosis in most Reference Laboratories.

**ПОЯВЛЕНИЕ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ
НЕЙРАМИНИДАЗОЙ, ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
СЕЗОННЫХ ШТАММОВ A(H3N2)
В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ MDCK**

NEURAMINIDASE-MEDIATED HEMAGGLUTINATION, ARISING
DURING SEASONAL INFLUENZA A(H3N2) VIRUSES PROPAGATION
IN MDCK CELLS

С. В. Святченко, А. Г. Дурыманов, Н. П. Колосова, А. Н. Швалов,
Н. И. Гончарова, И. М. Суслопаров, А. С. Гудымо, В. Ю. Марченко,
Т. В. Трегубчак, А. Б. Рыжиков, Т. Н. Ильичева

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

S. V. Svyatchenko, A. G. Durymanov, N. P. Kolosova, A. N. Shvalov,
N. I. Goncharova, I. M. Susloparov, A. S. Gudymo, V. Y. Marchenko,
T. V. Tregubchak, A. B. Ryzhikov, T. N. Ilyicheva

FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

Аннотация

Пассирование сезонных вирусов гриппа A(H3N2) в культуре клеток MDCK может приводить к появлению аминокислотных замен D151G и D151N в нейраминидазе и возникновению у нейраминидазы способности к гемагглютинации.

Abstract

Seasonal influenza A(H3N2) viruses propagation in MDCK cells can result in D151G and D151N mutations in neuraminidase, which are associated with neuraminidase-mediated hemagglutination.

На протяжении последних 20 лет наблюдается сужение спектра видового разнообразия эритроцитов, которые сезонный вирус гриппа A(H3N2) способен агглютинировать. Если ранее в спектр входили эритроциты петуха, индейки, морской свинки, то с 2001 года вирусами A(H3N2) была утрачена способность к гемагглютинин-опосредованной агглютинации эритроцитов петуха, с 2005 года — индейки, а значительная доля циркулирующих в настоящее время штаммов из клады 3С.2а не способна агглютинировать даже

© С. В. Святченко, А. Г. Дурыманов, Н. П. Колосова, А. Н. Швалов, Н. И. Гончарова, И. М. Суслопаров, А. С. Гудымо, В. Ю. Марченко, Т. В. Трегубчак, А. Б. Рыжиков, Т. Н. Ильичева, 2018.

эритроциты морской свинки. Тем не менее, проведение нескольких пассажей вирусов A(H3N2) в культуре клеток MDCK позволяет получать вирусные препараты, у которых появляется способность к агглютинации, которая пропадает при добавлении ингибитора нейраминидазы осельтамивира. Данный феномен ассоциируют с появлением при культивировании в нейраминидазе аминокислотных замен D151G или D151N, отсутствующих в вирусе из первичного материала. Было показано, что наблюдаемая в данном случае осельтамивир-чувствительная агглютинация обусловлена не гемагглютинином, а нейраминидазой. Данные аминокислотные замены приводят к тому, что в непосредственной близости от каталитического центра нейраминидазы возникает дополнительный сайт связывания сиаловых кислот, в котором происходит связывание сиаловых кислот, устойчивых к гидролитической активности фермента. При этом ферментативная активность нейраминидазы не страдает: она по-прежнему остается способной отщеплять терминальные сиаловые кислоты, являющиеся рецепторами для гемагглютинина, обеспечивая тем самым выход вирионов из инфицированной клетки. В связи с тем, что возникающий сайт связывания находится вблизи от активного центра фермента, добавление конкурентных ингибиторов нейраминидазы, блокирующих каталитический центр, приводит к ингибированию не только гидролитической активности фермента, но и агглютинации, опосредованной нейраминидазой [1].

Селекцию вирусной субпопуляции, имеющей в нейраминидазе аминокислотные замены D151G и D151N, связывают с пассивированием вируса в культуре клеток MDCK. Было показано, что на протяжении последних нескольких лет сродство гемагглютинина вирусов A(H3N2) к $\alpha 2,6$ -связанным сиаловым кислотам, рассматриваемым в качестве основных рецепторов для сезонных штаммов вируса гриппа А в верхних дыхательных путях человека, постепенно снижается [1]. Концентрация целевых $\alpha 2,6$ -связанных рецепторов на поверхности клеток MDCK считается относительно невысокой, что связано с присутствием на их поверхности еще и $\alpha 2,3$ -связанных сиаловых кислот. При выделении вирусов A(H3N2) в условиях, когда концентрация рецепторов недостаточна, а сродство к ним снижено, штаммы, способные связываться с клеткой не только через гемагглютинин, но и через нейраминидазу, получают преимущество в репродукции. Данный феномен затрудняет проведение антигенной характеристики гемагглютинина выделенных в системе MDCK вирусов с помощью реакции торможения гемагглютинации, являющейся ключевым методом сопоставления антигенных свойств циркулирующих штаммов со штаммами входящими в вакцину, по результатам которого может быть принято решение по смене штаммов в составе вакцины. Факт наличия торможения гемагглютинации таких пас-

сацией референсной сывороткой будет характеризовать антигенные свойства не гемагглютинина, а нейраминидазы. По существующим на сегодняшний день представлениям, именно наличие антител к гемагглютинуину считается наиболее значимым протективным фактором, поэтому при выборе вакцинного штамма в первую очередь рассматриваются характеристики гемагглютинина. В связи с этим, в Сотрудничающих центрах ВОЗ по гриппу на протяжении последних нескольких лет стало внедряться рутинное добавление 20 нМ осельтамивира при постановке РТГА с вирусами А(Н3N2), позволяющее ингибировать агглютинацию, опосредованную нейраминидазой, сохраняя гемагглютинин-зависимую гемагглютинацию.

Начиная с эпидемического сезона 2016–2017 в отделе зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора также стало проводиться сравнение способности выделенных нами штаммов А(Н3N2) агглютинировать эритроциты морской свинки в присутствии осельтамивира и без него. В эпидемическом сезоне 2016–2017 гг. в культуре клеток MDCK нами было выделено 76 изолятов вируса гриппа А(Н3N2). При этом на первом пассаже подавляющее большинство из них не агглютинировало эритроциты морской свинки, агглютинация появлялась лишь на втором или третьем пассаже. Для 18 штаммов была определена полногеномная нуклеотидная последовательность с использованием секвенирования нового поколения на платформе MiSeq, Illumina. Все 18 штаммов были отнесены к генетической кладе 3С.2а. Был проведен анализ полиморфизмов в гене нейраминидазы. У пяти штаммов было выявлено наличие субпопуляции с аминокислотной заменой D151N. Еще у двух штаммов были представлены субпопуляции, имеющие в положении 151 три различных аминокислоты: D (аспартат), N (аспарагин) и G (глицин). Для штаммов были определены гемагглютинационные титры с эритроцитами морской свинки с добавлением 20 нМ осельтамивира и без него. Снижение титра в присутствии осельтамивира наблюдалось именно среди штаммов, имеющих полиморфизм в положении 151 (см. таблицу).

Таким образом, было показано, что изоляты циркулирующих на территории Российской Федерации вирусов А(Н3N2), выделенные в культуре клеток MDCK, могут содержать аминокислотные замены D151G и D151N, ассоциируемые с возникновением гемагглютинации, опосредованной нейраминидазой. Пренебрежение данным фактом может приводить к ошибочным заключениям при проведении антигенной характеристики штаммов в РТГА. В связи с этим важным является добавление осельтамивира при постановке РТГА со штаммами А(Н3N2). Следует также внедрять иные способы антигенной характеристики, такие как микронеутрализация. Кроме того, возникновение при культивировании на MDCK аминокислотных замен в активном

**Соотношение субпопуляций вирусов А(Н3N2),
имеющих разные аминокислоты
в позиции 151 нейраминидазы (MiSeq, Illumina)**

№	Штамм А(Н3N2)	Доля популяции с данной аминокислотой в положении 151 нейраминидазы (%)			Снижение гемагглютинационного титра при добавлении осельтамивира (20 нМ)
		D	N	G	
1	A/Samara/640/2016	73,6	26,3	–	есть
2	A/Samara/711/2016	98,2	1,8	–	нет
3	A/Stavropol/3/2017	46,6	53,2	–	есть
4	A/Stavropol/4/2017	98,5	–	1,4	нет
5	A/Voronezh/1/2017	99,2	–	–	нет
6	A/Noyabrsk/7/2016	99,6	–	–	нет
7	A/Kurgan/24/2016	99,7	–	–	нет
8	A/Novy Urengoy/1329/2016	99,3	–	–	нет
9	A/Ekaterinburg/3/2017	35,1	40,1	24,5	есть
10	A/Novosibirsk/01/2017	79,3	20,6	–	Не агглютинирует
11	A/Novosibirsk/04/2017	71,1	2,3	26,5	есть
12	A/Novosibirsk/D1/2016	95,2	4,7	–	есть
13	A/Omsk/4150/2016	97,2	2,6	–	нет
14	A/Krasnoyarsk/22/2017	99,8	–	–	нет
15	A/Krasnoyarsk/1430/2017	89,2	10,8	–	есть
16	A/Krasnoyarsk/1807/2017	99,5	–	–	Не агглютинирует
17	A/Surgut/73/2017	99,7	–	–	нет
18	A/Chita/927/2017	99,5	–	–	нет

сайте нейраминидазы, к которому относится положение 151, может приводить к возникновению резистентности к антинейраминидажным препаратам [2]. В связи с этим, Сотрудничаящими центрами ВОЗ рекомендуется для выделения вирусов Н3N2 использование клеточной линии MDCK-SIAT, по-

лученной генно-инженерным методом и характеризующейся повышенным содержанием на поверхности клеток $\alpha 2,6$ -связанных сиаловых кислот, культивирование на которой не приводит к селекции популяций вирусов с описанными аминокислотными заменами.

Литература

1. Y. P. Lina, X. Xionga, S. A. Whartona et al. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin // PNAS. 2012. Vol. 109, N 52. P. 21474–21479.
2. Mishin V. P., Sleeman K., Levine M. Et al. The effect of the MDCK cell selected neuraminidase D151G mutation on the drug susceptibility assessment of influenza A(H3N2) viruses // Antiviral Res. 2014. N 101. P. 93–96.

**ФИЛОГЕНЕЗ ГЕНОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА
И НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ШТАММА
ВИРУСА ГРИППА А (H5N1), ВЫДЕЛЕННОГО
ОТ ЧАЙКИ В КАЗАХСТАНЕ В 2015 Г.**

PHYLOGENESIS OF HEMAGGLUTININ AND NEURAMINIDASES
GENES OF HIGHLY PATHOGENIC INFLUENZA A (H5N1) VIRUS,
ISOLATED FROM GULL
IN KAZAKHSTAN IN 2015

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

ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии», г. Алматы

S.A. Suleymenova, K. Kh. Zhumatov, A. I. Kydyrmanov, K. O. Karamendin,
E. Ya. Khan, E. T. Kasymbekov, K. D. Daulbayeva, M. Kh. Sayatov

LLP “SPC of Microbiology and Virology”, Almaty

Аннотация

В статье представлены результаты филогенетического анализа генов поверхностных белков — гемагглютинаина и нейраминидазы вируса гриппа А подтипа H5N1, изолированного от чайки на территории Республики Казахстан в 2015 г. Делается вывод о необходимости постоянного мониторинга орнитофауны Казахстана с целью изоляции текущих вариантов возбудителей.

Abstract

The article presents the results of phylogenetic analysis of surface protein hemagglutinin and neuraminidase genes of influenza A virus of H5N1 subtype isolated from gull in the territory of the Republic of Kazakhstan in 2015. It is concluded that it is necessary to continuously monitor the avifauna of Kazakhstan in order to isolate current variants of pathogens.

Птицы водного и околотоводного комплексов играют основную роль в сохранении вирусов гриппа А в биосфере. От них изолированы все известные для науки разновидности патогенов, вызвавших пандемии и эпизоотии, они являются резервуаром и источником возникновения новых вариантов возбудителей [1, 2, 3].

Классификация вирусов гриппа А базируется на антигенных различиях HA и NA, выявляемых в серологических реакциях с помощью иммунных сывороток, а также в ПЦР с использованием специфических праймеров; к настоящему времени идентифицированы 18 подтипов HA и 11 — NA.

Вирусы гриппа А подтипа H5 занимают особое место в современной эпидемиологии. Ранее считалось, что возбудители гриппа птиц, как правило, не распространяются среди людей. События, произошедшие на рубеже XXI века в странах Юго-Восточной Азии и на европейском континенте, опровергли это представление. На эпидемическую арену вышел «птичий» грипп H5N1, по данным ВОЗ с мая 1997 г. по 2 марта 2018 г. из 860 случаев с официально подтвержденным диагнозом гриппа А (H5N1) у людей 454 завершились летальным исходом [4].

В РК в 2014–2016 гг. от диких птиц выделены 8 изолятов вируса гриппа А/H5 [5]. Целью настоящего исследования явилось определение таксономической принадлежности казахстанского изолята вируса гриппа А (H5N1), выделенного от дикой птицы в Западном Казахстане.

Вирус гриппа А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1), выделенный от чайки в Западном Казахстане, клонировали и пассировали методом предельных разведений на 10–11-дневных развивающихся куриных эмбрионах по общепринятой методике.

Экстракцию РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden) в соответствии с рекомендациями производителя.

Комплементарные ДНК из РНК получали методом обратной транскрипции при помощи универсального праймера uni-12 для вирусов гриппа А из набора First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) согласно наставлений производителя.

ДНК секвенировали в ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии» с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов на автоматическом 8-капиллярном секвенаторе ABI 3500 DNA analyzer (Applied Biosystems).

Выравнивание последовательностей генома вируса гриппа А с полными нуклеотидными последовательностями таковых из международной базы данных проводили с помощью компьютерной программы BioEdit.

Филогенетический анализ и построение древ осуществлено с помощью программ BioEdit и MEGA версий 4–6 методом «присоединения соседей» со значениями Bootstrap на основе 1000 повторов [6].

После секвенирования ДНК-копий фрагментов генов HA и NA казахстанского изолята, проведено их выравнивание с соответствующими нуклеотидными последовательностями вирусов этого подтипа из международного банка GenBank. Размеры сегментов генов HA и NA вируса гриппа А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1) составляют 700 и 649 пар оснований, номера депонентов в GenBank — GU953249 и GU953250, соответственно.

На рис. 1 показана токсаномическая принадлежность гена НА вируса А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1) и других представителей этого подтипа из GenBank.

Как видно из рис. 1, вирус А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1) по гену НА наиболее близок к вирусу из Индии А/duck/India/11CA08/2014 (H5N1) и двум штаммам из Нигерии и Кот-д'Ивуара — А/chicken/Nigeria/15VIR339-1/2015 (H5N1) и А/duck/Ivory Coast/15VIR2742-2/2015 (H5N1), с которыми он входит в клайд 2.3.2.1С.

На рис. 2 представлены филогенетические взаимоотношения между генами НА вируса А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1) и вирусом подтипа H5 из GenBank.

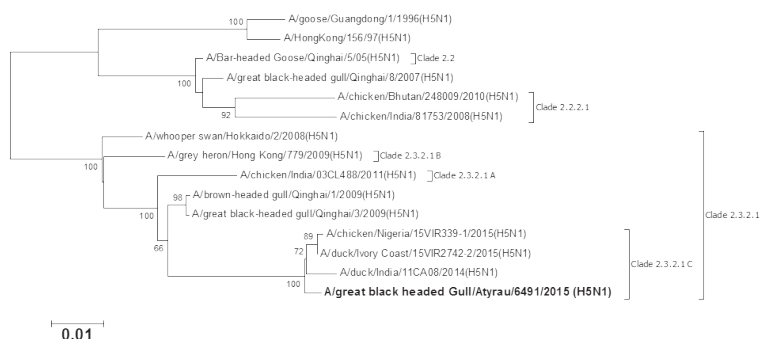


Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения между генами НА вируса А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1) и вирусов этого подтипа из GenBank

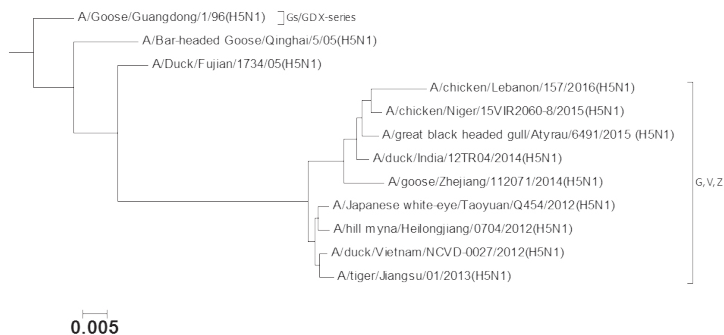


Рис. 2. Филогенетические взаимоотношения между генами НА вируса А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1) и вирусов подтипа H5 из GenBank

Как следует из рис. 2, казахстанский изолят А/черноголовый хохотун/Атырау/6491/15 (H5N1) наибольшее родство проявляет с вирусами из Нигера и Индии, выделенными от домашних птиц -A/chicken/Niger/15VIR2060-8/2015 (H5N1), A/duck/India/12TP04/2014 (H5N1). Вместе с шестью другими вирусами из Ливана, Китая и Вьетнама они по гену НА относятся к генотипам G, V, Z. Интересно отметить, что один из них — A/tiger/Jiangsu/01/2013 (H5N1) выделен от кошачьих.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в дикой орнитофауне Казахстана циркулируют актуальные, высокопатогенные вирусы гриппа. Обитание на территории республики огромного количества перелетных птиц и их видовое разнообразие объясняют необходимость постоянного эколого-вирусологического мониторинга с целью изоляции текущих современных вариантов возбудителей.

Литература

1. Kilbourne E. D. Influenza pandemics of the 20th century *Emerging Infect. Dis.* 2006. Vol. 12 (1). P. 9–14.
2. Taubenberger J., Johan V., David M. Discovery and characterization of the 1918 pandemic influenza virus in historical context//*Antivir. Ther. (Lond.)* 2007. Vol. 12. P. 581–591. PMID: 17944266 PMCID: PMC2391305
3. Chen Ji-M., Sun Yi-X., Chen J-W., Liu Sh., Yu J-M., Shen Ch-J., Sun X-D., Peng D. Panorama phylogenetic diversity and distribution of type A influenza viruses based on their six internal gene sequences//*Virol. J.*—2009. 6:137.-doi:10.1186/1743-422X-6-137. PMID: 19737421 PMCID: PMC2746212
4. WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/
5. Саятов М. Х., Жуматов К. Х., Кыдырманов А. И., Карамендин К. О., Даулбаева К. Д., Асанова С. Е., Касымбеков Е. Т., Хан Е. Я., Сулейменова С. А. Мониторинг вирусов гриппа А в дикой орнитофауне Казахстана // Доклады НАН РК. — 2017. № 2. С. 130–136.
6. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0//*Mol. Biol. Evol.* 2007. Vol. 24. P. 1596–1599. PMID: 17488738 DOI: 10.1093/molbev/msm092

**МЕХАНИЗМЫ СЕЛЕКЦИИ ВИРУСА ECHO11
ПРИ АДАПТАЦИИ К КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК RD И Л-41 КД/84**

**ECHOVIRUS 11 SELECTION MECHANISMS DURING ADAPTATION
TO RD AND L-41KD/84 CELL LINES**

П. С. Усольцева, А. В. Резайкин, А. В. Новоселов

*ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных
инфекций» Роспотребнадзора, Екатеринбург, Россия*

P. S. Usoltseva, A. V. Rezaikin, A. V. Novoselov

*FBIS "Yekaterinburg Scientific Research Institute of Viral Infections"
of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and
Human Well-Being, Yekaterinburg, Russian Federation*

E-mail: savina_polina@mail.ru

Аннотация

Целью данного исследования являлось выяснение механизмов селекции вариантов вируса ECHO11 с различной рецепторной специфичностью при репродукции на клеточных культурах RD и Л-41 КД/84. Изучена динамика численности вирусной популяции в одиночном цикле репродукции у двух близкородственных клонов вируса: *daf*⁺ клона, использующего первичный клеточный рецептор DAF, и *daf*[–] клона, не использующего данный рецептор. Негативная селекция *daf*[–] клона на клетках RD связана с пониженной интенсивностью депротенинизации и с меньшей эффективностью синтеза новых вирионов по сравнению с *daf*⁺ клоном. Негативная селекция *daf*⁺ клона на клетках Л-41 КД/84 связана с более низким уровнем адсорбции вируса на поверхности клеток, низкой интенсивностью депротенинизации и задержкой синтеза новых вирионов по сравнению с *daf*[–] клоном.

Abstract

The aim of this study was to elucidate the selection mechanisms affecting reproduction of echovirus 11 variants with different receptor specificity in RD and L-41KD/84 cell lines. Single cycle growth curves were obtained for two closely related clones of the virus: the *daf*⁺ clone using DAF as a primary cell receptor and the *daf*[–] clone that does not use this receptor. Negative selection of the *daf*[–] clone in RD cells was associated with decreased intensity of uncoating and lower efficiency of synthesis of new virions as compared to the *daf*⁺ clone. Negative selection of the *daf*⁺ clone in L-41KD/84 cells was associated with a lower level of virus adsorption on the cell surface, low intensity of uncoating, and delayed synthesis of new virions as compared to the *daf*[–] clone.

В большинстве случаев инфицирование энтеровирусами приводит к развитию инapparантной инфекции с кратковременным вирусоносительством, однако могут развиваться и манифестные формы, клинические проявления которых крайне разнообразны и обусловлены поражением практически любых органов и систем человека, включая ЦНС [1]. Мультиотропность энтеровирусов подразумевает способность к репродукции в различных тканях и органах за счёт использования различных клеточных рецепторов и соответствующих им путей интернализации вирусов в клетку. Изучение процессов интернализации энтеровирусов, депротеинизации вирусной РНК и её транслокации в цитозоль обеспечивает понимание молекулярных механизмов энтеровирусной инфекции на субклеточном уровне, что является одной из важнейших задач фундаментальной вирусологии.

Ранее было показано, что репродукция вируса ECHO11 (E-11) в течение нескольких пассажей на культуре клеток RD обеспечивала постепенную позитивную селекцию *Daf*⁺ вариантов, а пассажи вируса на культуре клеток Л-41 КД/84 обеспечивали постепенную позитивную селекцию *Daf*[–] вариантов [2, 3]. Рецептор DAF, как и другой (неидентифицированный) клеточный рецептор, экспрессируются на обеих культурах клеток, поэтому целью данного исследования было выяснение механизмов селекции, связанных с параметрами репродукции клонов вируса E-11, использующих разные первичные рецепторы на двух видах клеток. Анализ динамики численности вирусных популяций в опытах с одиночным циклом репродукции (ОЦР) позволил сравнить клоны по следующим параметрам: уровень адсорбции на монослойной культуре клеток, интенсивность депротеинизации и эффективность синтеза новых вирионов.

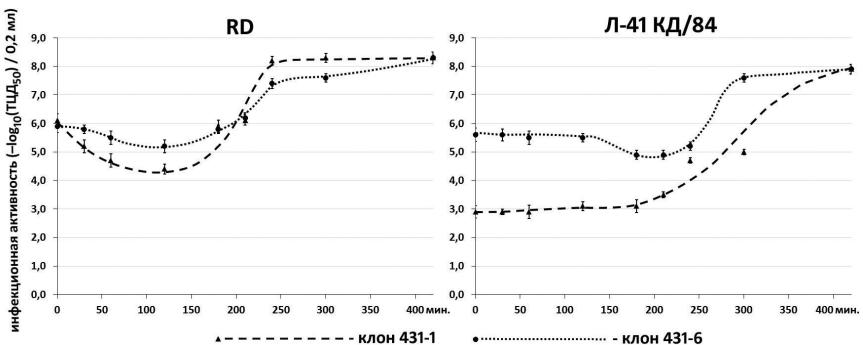
В работе использовали перевиваемые линии клеток RD и Л-41 КД/84. Два близкородственных (*daf*⁺ и *daf*[–]) клона вируса E-11 были получены и охарактеризованы ранее [4]. Клон 431-1 (*daf*⁺), использующий DAF в качестве первичного клеточного рецептора, и клон 431-6 (*daf*[–]), использующий другой (неидентифицированный) клеточный рецептор, отличались единственной аминокислотной заменой T165A в капсидном белке VP2 в области сайта связывания с рецептором DAF. Для синхронизации начала ОЦР, плотный монослой соответствующей культуры клеток в пластиковых флаконах, после замены среды роста на среду поддержания, охлаждали 20 минут при температуре 4 °С. Затем, после удаления среды поддержания, во флаконы вносили по 400 мкл инокулята из расчета множественности заражения 10 БОЕ на клетку. Флаконы инкубировали на платформе покачивателя при 4 °С 45 минут, тщательно удаляли инокулят и 3-кратно отмывали монослой от несвязавшегося вируса охлажденной до 4 °С средой поддержания. Далее в каждый флакон добавляли по 5 мл среды поддержания комнатной

температуры и нагревали в термостате до 37 °С. Через заданные интервалы времени инфекционный цикл останавливали, замораживая флаконы при –70 °С. Инфекционную активность вирусосодержащих жидкостей оценивали методом конечных разведений (в ТЦД₅₀). Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами вариационной статистики.

Динамика численности вирусных популяций в опыте ОЦР клонов 431-1 и 431-6 вируса E-11 в культурах клеток RD и Л-41 КД/84 представлена на рис. 1.

В культуре клеток RD при одинаковой заражающей дозе у двух клонов не наблюдалось различия в остаточной инфекционной активности после отмывания монослоя (точка 0 минут), что указывало на отсутствие различий в уровне адсорбции на клетках. Интенсивность депротеинизации *daf*⁺ клонна 431-1 была выше, чем у *daf*[–] клонна 431-6, о чем свидетельствовало более быстрое снижение инфекционной активности в точках 30, 60 и 120 минут. Восходящий участок графика инфекционной активности в ОЦР отражал эффективность синтеза новых вирионов в единицу времени, которая была выше у клонна 431-1 по сравнению с клоном 431-6.

При одинаковой заражающей дозе, уровень остаточной инфекционной активности после отмывания монослоя клеток Л-41 КД/84 у *daf*[–] клонна 431-6 более чем на два порядка величины превышал таковой у *daf*⁺ клонна 431-1. Максимальная интенсивность депротеинизации *daf*[–] клонна 431-6 наблюдалась через 180 и 210 минут после начала ОЦР, в то время как у *daf*⁺ клонна 431-1 роста интенсивности депротеинизации не наблюдалось. Сравнение восходящих участков графиков ОЦР в культуре клеток Л-41 КД/84 показало меньшую эффективность синтеза новых вирионов у *daf*⁺ клонна 431-1, так как рост инфекционной активности запаздывал по сравнению с клоном 431-6.



Результаты определения инфекционной активности в одиночном цикле репродукции клонов 431-1 и 431-6 вируса E-11 на культурах клеток RD и Л-41 КД/84

Таким образом, механизмы негативной селекции *daf*⁻ клона 431-6 в культуре клеток RD связаны с пониженной интенсивностью депротеинизации и с меньшей эффективностью синтеза новых вирионов по сравнению с *daf*⁺ клоном 431-1. Механизмы негативной селекции *daf*⁺ клона 431-1 в культуре клеток Л-41 КД/84 связаны с пониженным уровнем адсорбции вируса на клетках, низкой интенсивностью депротеинизации и отсроченным началом синтеза новых вирионов.

Выявленные существенные различия интенсивности депротеинизации *daf*⁺ и *daf*⁻ клона вируса Е-11 в культуре клеток RD согласуются с установленным ранее различием путей интернализации и внутриклеточного трафика *daf*⁺ и *daf*⁻ клонов Е-11 в клетках RD [5].

Литература

1. Канаева О. И. Энтеновирусная инфекция: многообразие возбудителей и клинических форм // Инфекция и иммунитет. 2014. 4(1): 27–36.
2. Новоселов А. В. Генетический анализ гемагглютинирующих свойств энтеровирусов (на модели вируса ЕСНО 11): автореферат дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.06: защищена 10.06.1994 // Новоселов Алексей Владимирович; Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН — М., 1994. — 23 с.
3. Фадеев Ф. А. Изменчивость рецепторной специфичности вируса ЕСНО11: автореферат дисс. канд. биол. наук: 03.00.06: защищена 27.10.2008 // Фадеев Федор Алексеевич; Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского РАМН. — М., 2008. — 24 с.
4. Novoselov A. V., Rezaykin A. V., Sergeev A. G., Fadeyev F. A., Grigoryeva J. V., Sokolova Z. I. A single amino acid substitution controls DAF-dependent phenotype of echovirus 11 in rhabdomyosarcoma cells. *Virus Res.* 2012; 166(1–2): 87–96; doi:10.1016/j.virusres.2012.03.007.
5. Stuart A. D., Eustace H. E., McKee T. A., Brown T. D. K. A novel cell entry pathway for a DAF-using human enterovirus is dependent on lipid rafts. *J. Virol.* 2002; 76 (18): 9307–9322; doi: 10.1128/JVI.76.18.9307–9322.2002.

**АНАЛИЗ ГЕНОМОВ БАКТЕРИОФАГОВ,
ИНФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИИ РОДА *KLEBSIELLA******THE ANALYSIS OF THE GENOMES
OF THE BACTERIOPHAGES INFECTING BACTERIA
OF THE *KLEBSIELLA* GENUS**

М. В. Фофанов^{1,2}, М. Р. Клопотова^{1,2}, Ю. Н. Козлова¹,
А. Ю. Тикунов¹, В. В. Морозова¹

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН, лаборатория молекулярной микробиологии
(ИХБФМ СО РАН, ЛММБ)*

² *Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет*

M. V. Fofanov^{1,2}, M. R. Klopotova^{1,2}, Y. N. Kozlova¹,
A. Y. Tikunov¹, V. V. Morozova¹

¹ *ICBFM SB RAS, Russia*

² *Novosibirsk State University, Russia*

E-mail: MVFofanov@mail.ru

Аннотация

В ходе данной работы была охарактеризована группа клебсиелльных бактериофагов, принадлежащих к семействам *Podoviridae* (KP192, KP194, KP 195, KP 196) и *Myoviridae* (KP179) и проанализированы их геномы. Было выявлено, что геномы исследуемых бактериофагов имеют кластерное строение, среди них кластер генов метаболизма нуклеиновых кислот (ДНК/РНК полимеразы, лигазы и эндонуклеазы), кластер структурных генов, кодирующих составные части капсида, и кластер генов литической кассеты (лизозим, холин и т. д.). В геноме бактериофага KP179 выделяется также кластер генов, кодирующих различные тРНК, и некоторые другие гены, кодирующие, например, анти-сигма фактор и ферменты, ингибирующие хозяйскую систему рестрикции-модификации. Все исследованные геномы также содержат большое количество генов, кодирующих гипотетические белки. В результате бактериофаги KP192-KP196 были отнесены к роду *KP32-virus* семейства *Podoviridae*, а KP179 — к роду *Jd18-virus* семейства *Myoviridae*.

© М. В. Фофанов, М. Р. Клопотова, Ю. Н. Козлова, А. Ю. Тикунов, В. В. Морозова, 2018.

* Исследование проведено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-29-08015.

Abstract

In this study, some genomes of *Klebsiella* bacteriophages belonging to the *Podoviridae* (KP192, KP194, KP195, KP196) and *Myoviridae* (KP179) families were analyzed. It was shown these genomes have cluster structure, which consist of metabolism genes of nucleic acids (DNA/RNA polymerases, ligases and endonucleases), cluster of structure genes encoded lytic cassette (lysozyme, holin, etc). KP179 has some particular genes encoded different tRNAs and some other genes such as anti-sigma factor and enzymes inhibiting the host's restriction-modification system. These annotated genomes have also many genes encoded hypothetical proteins. As a result, bacteriophages KP192-KP196 belongs to the *KP32-virus* genus of the *Podoviridae* family and KP179 — to the genus *Jd18-virus* of the *Myoviridae* family.

В лаборатории молекулярной микробиологии ИХБФМ СО РАН ранее были выделены из клинических образцов 5 штаммов бактериофагов (KP192, KP194, KP195, KP196, KP179), специфичных к бактериям рода *Klebsiella*. Бактериофаги были охарактеризованы по спектру бактериальных штаммов-хозяев (см. таблицу) и по биологическим свойствам. Геномы бактериофагов были секвенированы с использованием методов высокопроизводительного секвенирования на приборе MiSeq (Illumina, США).

Бактериофаги, специфичные к штаммам рода *Klebsiella* и спектры их бактериальных штаммов-хозяев

№	Бактериофаг	Бактерия, к которой специфичен бактериофаг	Штамм-хозяин из коллекции ЭМТК, с использованием которого выделен бактериофаг	Идентификационные номера чувствительных штаммов из КЭМТК ИХБФМ СО РАН*
1	KP192	<i>K. pneumoniae</i>	2274	2291, 2548, 2574
2	KP194	<i>K. pneumoniae</i>	2291	2274, 2548, 2574
3	KP195	<i>K. pneumoniae</i>	2337	-
4	KP196	<i>K. oxytoca</i>	2487	-
5	KP179	<i>K. pneumoniae</i>	2544	1755, 1756, 1922, 2148, 2545, 2827

Примечание. * КЭМТК — Коллекция экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН.

В ходе анализа геномных последовательностей с использованием программного обеспечения Vector NTI Advance 11.5.1, в геномах бактериофагов KP192-KP196 было выявлено около 40–47 предполагаемых открытых рамок считывания (ОРТ), а в геноме KP179 — 261 ОРТ при помощи программы

для автоматической аннотации геномов RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). Выявленные ОПТ идентифицировали с использованием базы данных GenBank Database, алгоритмом blastx.

В результате проведённого нами анализа были составлены геномные карты для всех исследованных бактериофагов.

Было выявлено, что геномы исследуемых бактериофагов имеют кластерное строение, т. е. гены определенной функциональной принадлежности сгруппированы в опероны. Таким образом, в геномах бактериофагов KP192-196 можно выявить три кластера, в первый из них входят гены метаболизма нуклеиновых кислот (ДНК/РНК полимеразы, лигазы и эндонуклеазы), далее идет кластер структурных генов, кодирующих составные части капсида, и кластер генов литической кассеты (лизозим, холин и т. д.), который обеспечивает лизис бактериальных клеток и выход из них фагового потомства. Также надо отметить, что 25–32 % генов этих бактериофагов кодирует гипотетические белки с неизвестными свойствами, которые не имеют сходства с аминокислотными последовательностями в GenBank Database. Геном бактериофага KP179 также кодирует 41 % (108/261) гипотетических белков с неизвестными свойствами

Таксономическую идентификацию исследуемых бактериофагов проводили с использованием наиболее близких геномных последовательностей бактериофагов из базы данных GenBank Database. Для этого был проведен филогенетический анализ этих последовательностей (рис. 1), по результа-

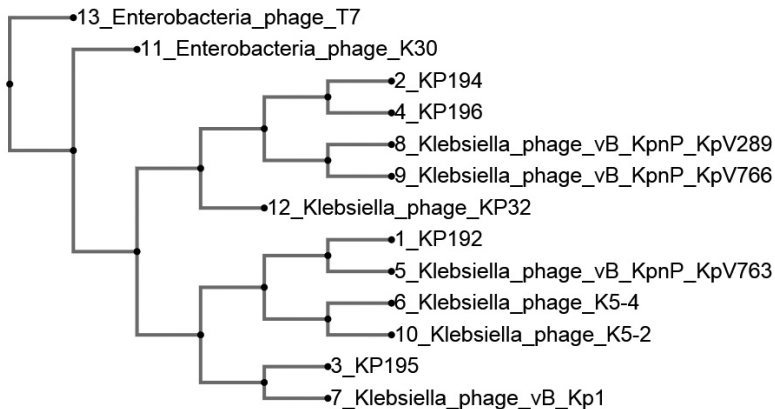


Рис. 1. Филогенетический анализ геномов бактериофагов KP192-KP196.

При построении был использован метод
ближайших соседей онлайн-сервиса MAFFT v.5.0

там которого было выявлено, что фаги KP192, KP194, KP195, KP196 являются родственными и относятся к роду *KP32-virus* семейства *Podoviridae*, прототипным представителем которого является клебсиелльный бактериофаг KP32 (GQ413937). В результате филогенетического анализа было также выявлено, что фаг KP192 и фаги KP194, KP195, KP196 относятся к разным кладам внутри данного рода.

С использованием программы BankIt аннотированные геномные последовательности бактериофагов KP192, KP194, KP195, KP196 были депонированы в GeneBank Database, где им были присвоены соответствующие идентификационные номера MN172261, MN172262, MN172263 и MN172264, соответственно. Геномная последовательность бактериофага KP179 также была депонирована с использованием данной программы.

В результате филогенетического анализа бактериофаг KP179 был отнесён к роду *Jd18-virus* семейства *Myoviridae* (рис. 2).

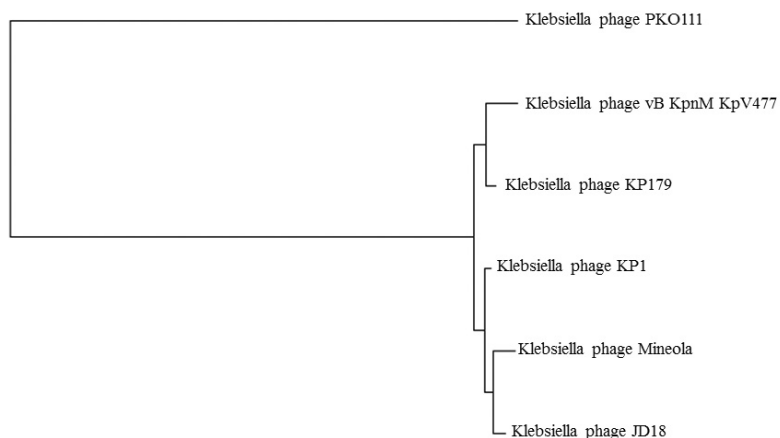


Рис. 2. Филогенетический анализ геномов бактериофага KP179. При построении был использован метод максимального правдоподобия программы MEGA X

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА
И НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА
А/ФАЗАН/БАЛХАШ/6218/14 (H1N1)**

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

*ТОО «Научно-производственный центр
микробиологии и вирусологии»*

Ye. Ya. Khan, A. I. Kydyrmanov, K. O. Karamendin, K. D. Daulbaeva,
S. E. Asanova, Ye. T. Kasymbekov, A. B. Seydalina, S. A. Suleymenova,
K. Kh. Zhumatov, M. Kh. Sayatov

«Scientific and Production Centre for Microbiology and Virology» LLP

E-mail: Lizaveta4ka@list.ru

Аннотация

В работе представлены результаты молекулярно-генетического изучения генов гемагглютинина и нейраминидазы вируса гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1).

Abstract

The results of molecular genetic researches of the hemagglutinin and neuraminidase genes of the influenza virus A/Pheasant/Balkhash/6218/14 (H1N1) are presented.

РНК-содержащие вирусы гриппа А семейства Orthomyxoviridae инфицируют человека, млекопитающих животных и птиц, и способны наносить громадный экономический и социальный урон. Они классифицируются на основе антигенных различий поверхностных гликопротеидов — гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА), к настоящему времени известны 18 подтипов НА и 11 — НА [1, 2, 3]. Вирусы гриппа А имеют сегментированный геном и способны к реассортации в процессе смешанной инфекции [4].

В 1918 году зарегистрирована пандемия гриппа А(H1N1), вызванная вирусом птичьего происхождения [5].

В настоящей работе представлены результаты молекулярно-генетического исследования вируса гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1).

© Е. Я. Хан, А. И. Кыдырманов, К. О. Карамендин, К. Д. Даулбаева, С. Е. Асанова, Е. Т. Касымбеков, А. Б. Сейдалина, С. А. Сулейменова, К. Х. Жуматов, М. Х. Саятов, 2018.

Изоляцию вируса проводили общепринятым методом в развивающихся куриных эмбрионах. Антигенную формулу определяли в реакциях торможения гемагглютинации и ингибции нейраминидазной активности (РТГА и РИНА). Для секвенирования кДНК использовали метод дидеоксисеквенирования по Сенгеру, выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа А с соответствующими нуклеотидными последовательностями из GenBank проводили по компьютерной программе BioEdit. Филогенетический анализ и построение древ выполняли с помощью программы и MEGA версии 4 методом «присоединения соседей» со значениями Bootstrap на основе 1000 повторов.

На рис. 1 представлены результаты BLAST анализа гена НА вируса гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1) с аналогичными последовательностями из базы данных GenBank.

Как видно из рисунка 1 ген НА вируса гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1) на 99 % сходен с таковыми пяти вирусов: A/mallard/Republic of Georgia/4/2012 (H1N1), A/mallard/Sweden/816/2014 (H1N1), A/duck/Hainan/Q47/2012 (H1N2), A/northern pintail/Egypt/EMC-2/2012 (H1N1), A/northern pintail/Egypt/EMC-3/2012 (H1N1). С шестью вирусами из GenBank отмечено 95 % родство, с 12 вирусами — 94 % сходство, пять вирусов оказались близкими на 93 %.

Следующим объектом изучения явился ген NA казахстанского изолята и других представителей этого подтипа.

Sequences producing significant alignments:

Select all items Selected 5

1 Alignments Download Graphics Distance tree of results

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
1	Influenza A virus (A/mallard/Republic of Georgia/4/2012(H1N1)) hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1273	1273	100%	0.0	96%	KF556811.1
2	Influenza A virus (A/mallard/Sweden/816/2014(H1N1)) gene A/Mallard/Sweden/816/2014 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1266	1266	100%	0.0	96%	KF228422.1
3	Influenza A virus (A/duck/Hainan/Q47/2012(H1N2)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1266	1266	100%	0.0	96%	KF556102.1
4	Influenza A virus (A/northern pintail/Egypt/EMC-2/2012(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, partial cds	1242	1242	94%	0.0	96%	KF556203.1
5	Influenza A virus (A/northern pintail/Egypt/EMC-3/2012(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, partial cds	1236	1236	94%	0.0	96%	KF556211.1
6	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1229	1229	100%	0.0	95%	KF556103.1
7	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1229	1229	100%	0.0	95%	KF556103.1
8	Influenza A virus (A/mallard/Republic of Georgia/4/2012(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, partial cds	1219	1219	99%	0.0	95%	KC389322.1
9	Influenza A virus (A/mallard/Republic of Georgia/4/2012(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1218	1218	100%	0.0	95%	KC389323.1
10	Influenza A virus (A/mallard/Republic of Georgia/4/2012(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1218	1218	100%	0.0	95%	KC389323.1
11	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1212	1212	100%	0.0	95%	KF556103.1
12	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1206	1206	100%	0.0	94%	KF284212.1
13	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1206	1206	100%	0.0	94%	KF556103.1
14	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1190	1190	100%	0.0	94%	KC389323.1
15	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1190	1190	100%	0.0	94%	KF556103.1
16	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1184	1184	100%	0.0	94%	KF284212.1
17	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1184	1184	100%	0.0	94%	KF556103.1
18	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1179	1179	100%	0.0	94%	KF556103.1
19	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1173	1173	100%	0.0	94%	KF556103.1
20	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1173	1173	100%	0.0	94%	KF556103.1
21	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1173	1173	100%	0.0	94%	KF556103.1
22	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1173	1173	100%	0.0	94%	KF556103.1
23	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1168	1168	100%	0.0	93%	KF556103.1
24	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1168	1168	100%	0.0	93%	KF556103.1
25	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1162	1162	100%	0.0	93%	KF556103.1
26	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1162	1162	100%	0.0	93%	KF556103.1
27	Influenza A virus (A/duck/Moscow/FA256/2013(H1N1)) segment 4 hemagglutinin (NA) gene, complete cds	1162	1162	100%	0.0	93%	KF556103.1

Рис. 1. Результаты BLAST анализа гена гемагглютинина вируса гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1) с последовательностями из базы данных GenBank

Как видно из рис. 2, выявлено 97 % сходство гена нейраминидазы вируса гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1) с тремя вирусами из Бангладеш, подобными A/duck/Bangladesh/24705/2015 (H7N1). С остальными 24 вирусами с NA N1 отмечена близость на 96 %.

[illegible]

Рис. 2. Результаты BLAST анализа гена нейраминидазы вируса гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1) с последовательностями из базы данных GenBank

В дальнейшем проведен анализ аминокислотных последовательностей функционально активных сайтов расщепления HA казахстанского изолята. Установлено, что вирус гриппа А/фазан/Балхаш/6218/14 (H1N1) имел последовательность GLRNIPSQSR↓GLF и не содержал вблизи сайта протеолитического расщепления HA основных аминокислот, характерных для высокопатогенных вариантов.

Литература

1. Webster R., Govorkova E. Continuing challenges in influenza // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014. Vol. 1323. P. 115–139.
2. Fouchier R. A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer TM., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G. F., Olsen B., Osterhaus A. D. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls // *J Virol* Vol. 79. P. 2814–2822
3. McKimm-Breschkin J. L. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance // *Influenza neuraminidase inhibitors: Antiviral action and mechanisms of resistance. Influenza and Other Respiratory Viruses.* 2012. P. 25–36.
4. Steinhauer D. A., Holland J. J. Rapid evolution of RNA viruses // *Annu Rev Microbiol.* Vol. 41. P. 409–433
5. Kilbourne ED Influenza pandemics of the 20th century // *Emerg. Infect. Dis.* 2006. Vol. 12. P. 9–14.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИЧ-1 СРЕДИ ЛИЦ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ В РЕСПУБЛИКЕ КЫРГЫЗСТАН, ВЫЯВИЛО ЗНАЧИМЫЕ ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЕ ОТЛИЧИЯ *

HIV-1 STUDY AMONG PEOPLE LIVING WITH HIV IN THE REPUBLIC OF KYRGYZSTAN REVEALED SIGNIFICANT TERRITORIAL DIFFERENCES

В. В. Хомколова¹, А. Ю. Аникина¹, А. В. Тотменин¹,
А. А. Бекболотов², У. К. Кадырбеков², Н. М. Гашникова¹

¹ *Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный
центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»*

Роспотребнадзора, пос. Кольцово, Новосибирская область

² *Республиканский Центр СПИД МЗ Кыргызской Республики,
г. Бишкек, Кыргызская Республика*

V. V. Khomkolova¹, A. Y. Anikina¹, A. V. Totmenin¹,
A. A. Bekbolotov², U. K. Kadyrbekov², N. M. Gashnikova¹

¹ *FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*

² *National Center for the Prevention and Control of HIV/AIDS,
Ministry of Health and Social Protection of the Republic of Kyrgyzstan*

E-mail: vera-usib@mail.ru

Аннотация

Для изучения молекулярной эпидемиологии ВИЧ-1 в Кыргызстане были получены последовательности гена *pol* ВИЧ-1 для ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в двух географически отдаленных районах: Джалал-Абадской и Чуйской областях республики. В Чуйской области доминировали субтип А (55,6 %) и CRF02_AG (40,7 %) ВИЧ-1. Только 3,7 % ВИЧ-1 не были классифицированы как чистый субтип или циркулирующая рекомбинантная форма (CRF). В Джалал-Абадской области была обнаружена генетически гетерогенная популяция ВИЧ-1. Филогенетический анализ показал, что уникальные рекомбинантные формы (URF) ВИЧ-1 являются основным генетическим вариантом (38,5 %), за которым следуют субтип А (30,8 %), CRF02_AG (25,6 %) и CRF63_02A1 (5,1 %). Различия в распределении генотипов

© В. В. Хомколова, А. Ю. Аникина, А. В. Тотменин, А. А. Бекболотов, У. К. Кадырбеков, Н. М. Гашникова, 2018.

* Исследование выполнено в рамках комплексной российской программы по оказанию помощи странам Восточной Европы и Центральной Азии в области профилактики и надзора за ВИЧ/СПИД (РП РФ от 14.11.2015 № 2314-р).

ВИЧ-1 не были связаны с путями передачи ВИЧ, с полом или возрастом пациентов. Примечательно, что пациенты из Джалал-Абада, принимающие АРВТ, имели более высокие показатели эффективности терапии.

Abstract

To study the molecular epidemiology of HIV-1 in Kyrgyzstan, we obtained HIV-1 pol sequences from HIV-infected individuals living in two geographically remote region: Jalal-Abad and Chui Oblast of the Republic. In Chui Oblast, subtype A (55,6%) and CRF02_AG (40,7%) HIV-1 were dominant. Only 3,7% HIV-1 were not classified in any pure subtype or circulating recombinant form (CRF). A heterogeneous genetic HIV-1 pool has been found in Jalal-Abad Oblast. Phylogenetic analyses indicated unique recombinant forms (URF) HIV-1 as the main genetic variant (38,5%), followed by subtype A (30,8%), CRF02_AG (25,6%) and CRF63_02A1 (5,1%). The differences in HIV-1 genotype distribution were not associated with transmission routes, sex or age of patients. Remarkably, patients of Jalal-Abad, who are taking ARVT, had higher efficacy rates of therapy.

В Кыргызской Республике (КР) за последние 10 лет количество людей, живущих с ВИЧ, увеличилось в восемь раз. На 01.06.2018 г в Республике зарегистрировано всего 8323 человек с ВИЧ-инфекцией, в том числе детей до 14 лет — 633. Большая часть людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), выявлена в Чуйской (3711) и Ошской (2489) областях. В последние годы активизация распространения ВИЧ-1 регистрируется и в географически отдаленных регионах страны с меньшей пораженностью населения ВИЧ — Джалал-Абадская (951), Баткенская (203) области, где до настоящего времени исследования циркулирующих ВИЧ-1 и резистентности вируса не проводилось.

Целью настоящей работы являлось изучение циркулирующих в Кыргызской Республике генетических вариантов ВИЧ-1 и анализ распространения мутаций ВИЧ-1, связанных с развитием резистентности вируса к антиретровирусной терапии (АРВТ).

В исследование в 2017–2018 гг было вовлечено 144 человека с диагнозом ВИЧ-инфекция, проживающих в Чуйской (80) и Джалал-Абадской (56) областях КР. На текущее время для 80 % клинических образцов, связанных с клинико-демографическими данными пациентов, были получены и расшифрованы фрагменты генома ВИЧ-1, кодирующие протеазу и ревертазу вируса. Филогенетический анализ выявил, что в Чуйской области доминируют субтип А (55,6 %) и CRF02_AG (40,7 %) ВИЧ-1. Варианты субтипа А (А6) близки к аналогичным ВИЧ-1, циркулирующим в РФ. Вирусы CRF02_AG принадлежат к специфическому среднеазиатскому кластеру ВИЧ-1 — CRF02_AG_{CA}. Формирование на филогенетическом дереве обособленных генетически близких кластеров CRF02_AG, реже — субтипа А ВИЧ-1 позволяет предположить, что распространение CRF02_AG

в КР преимущественно происходит по внутренним эпидемическим сетям. В 5,7 % случаев были выявлены отличающиеся уникальные рекомбинантные формы — UR F02_A1 ВИЧ-1, образованные в результате рекомбинации ВИЧ-1 субтипа А и CR F02_AG.

Так как все пациенты, вовлеченные в исследование, находились на АРВТ, проводилось исследование резистентности ВИЧ-1 и анализ вирусологической эффективности терапии. Для пациентов Чуйской области вирусологическая эффективность терапии составила 25,9 %, в 27 % случаев были выявлены мутации ВИЧ-1, связанные с развитием резистентности, в 37 % — регистрировалась высокая концентрация РНК ВИЧ-1 в крови пациентов при отсутствии мутаций ВИЧ-1, что может указывать на низкую приверженность/отказ ВИЧ-инфицированных лиц от АРВТ.

Абсолютно уникальной оказалась ситуация в Джалал-Абадской области. По результатам филогенетического и рекомбинационного исследования только одной области генома ВИЧ-1, кодирующей протеазу-ревертазу вируса, показано, что уникальные рекомбинантные формы (URF) ВИЧ-1 на данной территории являются преобладающими — такие вновь возникшие вирусы, не имеющие близких референсных штаммов, были описаны в 38,5 %. В 30,8 % был найден ВИЧ-1 субтипа А, в 27 % — CR F02_AG_{CA}. В 3,7 % были описаны ВИЧ-1, частично кластеризующиеся с сибирским вариантом CR F63_02A1. Для этих вариантов необходимо расшифровать более протяженные участки для корректности генотипирования, исключить возможность вторичной рекомбинации ВИЧ-1.

Трудно объяснимым является тот факт, что примерно одинаково выявлялись URF ВИЧ-1 среди лиц разного возраста (в том числе и среди детей), пола, инфицированных ВИЧ разными путями. При этом практически не было найдено эпидемиологических цепочек, генетически близких URF, формирующих отдельные филогенетические кластеры. В исследованной выборке пациентов все женщины были заражены при гетеросексуальных контактах, среди мужчин было примерно равное количество лиц, инфицированных половым путем и при потреблении инъекционных наркотиков (ПИН).

Примечательно, что пациенты из Джалал-Абада, принимающие АРВТ, имели более высокие показатели вирусологической эффективности терапии — 59 %. Резистентность ВИЧ-1 была обнаружена в 15,4 %, отказ от АРВТ/низкая приверженность — в 17,9 %.

Заключение

Выявлено, что увеличение генетического разнообразия циркулирующих в Кыргызской Республике ВИЧ-1 происходит за счет возникновения

новых рекомбинантных ВИЧ-1. Показано, что для Кыргызской Республики характерна территориальная специфика развивающихся процессов по распространению ВИЧ-инфекции. Впервые описана крайне высокая распространенность вновь возникающих уникальных рекомбинантных форм ВИЧ-1 в Кыргызстане. Появление и распространение новых генетических вариантов ВИЧ-1 может негативно сказаться на диагностике ВИЧ-инфекции. Слишком высокий показатель частоты рекомбинационных событий ВИЧ-1 может быть частично объяснен тем, что ВИЧ на данной территории распространяется не среди всего населения, а в основном среди определенных групп лиц, практикующих рискованное поведение, где циркулируют разные геноварианты вируса. Ситуация требует более глубокого молекулярно-эпидемиологического изучения. Джалал-Абад граничит с Узбекистаном и Ошской областью. Как показывают результаты наших текущих исследований ВИЧ-1, в Ошской области ситуация близка к Чуйской области. Данных по территориям Узбекистана нет.

РАЗДЕЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

МИКРОВЕЗИКУЛЫ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН В ПРОГРАММЕ ЭКО

MICROVESICLES IN FOLLICULAR FLUID WITH WOMEN IN IVF PROGRAM

Е. А. Андреева¹, Н. А. Хонина^{1,2}, Е. В. Баторов¹,
Н. М. Пасман², Е. Р. Черных¹

¹ *ФБГНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

E. A. Andreeva¹, N. A. Khonina^{1,2}, E. V. Batorov¹,
N. M. Pasman², E. R. Chernykh¹

¹ *Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

E-mail: evga_91@mail.ru, nkhonina@mail.ru

Аннотация

В последние годы особое внимание уделяется микровезикулам, которые выявляются во всех биологических жидкостях и имеют высокую диагностическую значимость при ряде заболеваний, в том числе при патологии репродукции. В данной работе показано, что повышенный уровень микровезикул в фолликулярной жидкости женщин ассоциирован с возрастом, формой бесплодия, с продолжительностью бесплодия и низким уровнем АМГ.

Abstract

In recent years, special attention is given to microvesicles. Microvesicles can be found in almost all biological fluids and has a significant potential as a new diagnostic and prognostic biomarker including reproductive pathologies. In this paper shown that an elevated level of microvesicles in women's follicular fluid is associated with the age, the form infertility, the duration of infertility and a low AMH levels.

Микровезикулы (МВ) представляют собой мембранные структуры, отделяющиеся от цитоплазматической мембраны клеток, окруженные фосфолипидной мембраной. Образование внутриклеточных везикул происходит в условиях *in vivo* и *in vitro*. Это физиологический процесс, однако, при активации клеток, воздействии стресса или в процессе апоптоза продуцируется их повышенное количество. МВ секретируются из различных типов клеток, таких как: лимфоциты, моноциты, макрофаги, дендритные и эпителиальные клетки. Поверхностная экспрессия МВ имеет маркеры «материнской» клетки. Наибольший интерес представляет МВ, отделившиеся в процессе апоптоза (характерный маркер AnnexinV). Другой антиген опосредованно участвующий в процессе апоптоза — трансмембранная тирозинфосфатаза (CD45), передает сигнал внутрь клетки с Т и В-клеточного рецепторов. Также активируются NK-клетки, запускается синтез протеолитических ферментов, в результате экспрессируется маркер CD107a, характеризующий цитотоксический потенциал NK. Возникшие апоптотические тельца фагоцитируются окруженными макрофагами, посредством скавенджер-рецепторов (рецепторов-«мусорщиков»): CD206 связывает сульфированные и несulfированные полисахариды, а также структуры с высоким содержанием манноз; CD14 -рецептор комплекса липополисахаридсвязывающего протеина с липополисахаридом. Появление МВ в биологических жидкостях организма отражает физиологический процесс развития и старения клеток, однако, повышенное их содержание ассоциировано с рядом патологических состояний (воспалительные, онко- и аутоиммунные процессы). Согласно данным литературы микровезикулы ФЖ участвуют в фолликулогенезе, мейозе ооцитов, стероидогенезе и профилактике полиспермии после оплодотворения. Можно предположить, что МВ играют роль в регуляции роста фолликула, посредством взаимобмена сигналами с клетками иммунной системы

Цель исследования

Исследовать уровень и фенотип МВ в ФЖ, и их потенциальную связь с клиническими характеристиками пациенток в цикле ЭКО.

Материалы и методы

В исследование было включено 32 женщины с бесплодием, проходивших лечение методом ЭКО и 5 фертильных женщин — доноров ооцитов. Всем женщинам проводилось комплексное обследование в соответствии с приказом №107н от 30.08.2012г. Исследование проводилось после получения письменного информированного добровольного согласия. Возраст женщин с бесплодием варьировал от 20 до 42 лет (медиана 33,0), длительность бесплодия — от 1 года до 18 лет (медиана 5,5). Первичное бесплодие было диагностировано у 59,4 %, вторичное — у 40,6 % женщин. Причиной бесплодия в 15,6 % случаев был мужской фактор, в 84,4 % случаев — женское бесплодие; из них 59,4 % женщин выявлен трубно-перитонеальный фактор, у 21,8 % — эндокринный фактор, у 3,2 % женщин регистрировалось сочетанное бесплодие. Процедура ЭКО была проведена у 32,4 % женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) — у 67,6 %. Сбор образцов ФЖ осуществляли во время трансвагинальной пункции яичников. Проводили пробоподготовку образцов ФЖ и криоконсервировали при -80°C . Фенотипическую характеристику МВ проводили методом проточной цитометрии в соответствии с протоколом производителя (BD Biosciences). Статистическую обработку данных проводили при помощи программы Statistica 6.0.

Результаты и обсуждения

Исследование содержания МВ в ФЖ показало, что значимых отличий в группе пациенток и доноров, а так же пациенток с разной причиной бесплодия, не получено. На основании этого данные группы были объединены при последующем анализе. Анализ образцов ФЖ женщин <35 лет и ≥ 35 лет выявил достоверные различия в уровне популяций МВ: у женщин ≥ 35 лет уровень AnnV^+ и $\text{AnnV}^+\text{CD107a}^+$ был в 1,7 и 1,3 раза соответственно выше, чем у женщин <35 лет (табл. 1).

Таблица 1

Содержание микровезикул в фолликулярной жидкости у женщин разных возрастных групп

Параметры МВ (мкл)	Возраст женщины (лет)		p_u
	<35 (n=26)	≥ 35 (n=11)	
1	2	3	4
AnnV^-	193,7 $\pm$ 17,3 185,9 (145,1–217,9)	223,3 $\pm$ 39,8 179,7 (127,4–270,7)	0,43
AnnV^+	24,6 $\pm$ 3,4 20,6(11,8–30,7)	41,6 $\pm$ 8,5 34,9 (22,8–51,4)	0,03

Окончание табл. 1

1	2	3	4
AnnV ⁻ CD45 ⁺	87,1±8,5 80,7 (63,4–105,9)	101,3±21,9 81,9 (50,3–138,1)	0,46
AnnV ⁻ CD107a ⁺	49,4±5,2 42,7 (33,4–61,7)	62,1±14,7 49,2 (26,7–86,5)	0,31
AnnV ⁻ CD206 ⁺	102,1±10,8 95,3 (68,0–120,7)	116,3±23,1 93,6 (61,9–159,7)	0,53
AnnV ⁻ CD14 ⁺	164,7±15,9 153,2 (117,4–200,3)	187,2±35,3 157,2 (98,7–230,1)	0,50
AnnV ⁺ CD45 ⁺	12,1±1,7 9,3 (6,4–15,3)	16,8±3,8 14,7 (8,0–23,3)	0,19
AnnV ⁺ CD107a ⁺	13,7±1,7 11,7 (6,9–18,6)	23,6±6,2 15,6 (12,5–28,7)	0,04
AnnV ⁺ CD206 ⁺	11,7±1,7 9,5 (6,2–11,7)	18,0±4,4 14,3 (9,1–21,7)	0,10
AnnV ⁺ CD14 ⁺	19,6±2,9 15,7 (9,3–25,6)	29,9±7,3 24,2 (14,1–32,2)	0,12

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, медианы, квартильного диапазона (LQ-UQ); p_u — U-критерий Манна — Уитни.

Исследование содержания МВ у женщин с разной формой бесплодия выявило, что в группе с вторичным бесплодием уровень AnnV⁻CD107a⁺ в ФЖ был в 1,4 раза достоверно выше, чем при первичном бесплодии (табл. 2). Полученные данные свидетельствуют о повышенной активации NK-клеток у женщин с невынашиванием беременности в анамнезе.

Таблица 2

**Содержание микровезикул в фолликулярной жидкости
у женщин с разной формой бесплодия**

Параметры	Форма бесплодия		
	Первичное (n=19)	Вторичное (n=13)	p_u
МВ (мкл)			
1	2	3	4
AnnV ⁻	181,3±14,4 185,1 (141,7–233,9)	243,5±40,0 188,9 (155,3–270,7)	0,11
AnnV ⁺	27,7±3,9 23,2 (12,8–39,4)	28,5±7,7 18,7 (11,8–30,7)	0,92

Окончание табл. 2

1	2	3	4
AnnV-CD45 ⁺	78,4±7,1 79,4 (57,2–95,8)	113,9±20,7 94,3 (63,7–138,1)	0,07
AnnV-CD107a ⁺	43,8±3,7 42,3 (33,9–52,3)	69,4±13,9 57,5 (33,4–86,5)	0,05
AnnV-CD206 ⁺	91,3±8,0 89,5 (61,9–105,8)	132,7±24,1 109,7 (68,5–159,7)	0,07
AnnV-CD14 ⁺	154,6±13,4 156,3 (107,7–206,4)	205,6±36,2 157,2 (119,0–230,1)	0,14
AnnV ⁺ CD45 ⁺	12,5±1,7 12,6 (7,4–15,5)	13,8±3,6 10,0 (6,4–14,8)	0,72
AnnV ⁺ CD107a ⁺	13,9±1,7 12,5 (9,7–18,8)	18,2±5,3 12,2 (6,9–15,1)	0,38
AnnV ⁺ CD206 ⁺	12,4±1,7 10,6 (8,8–15,9)	14,0±3,9 9,4 (6,2–11,7)	0,67
AnnV ⁺ CD14 ⁺	21,6±3,2 19,4 (11,1–32,2)	23,4±6,6 16,1 (9,3–25,6)	0,79

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, медианы, квартильного диапазона (LQ-UQ); p_u — U-критерий Манна — Уитни.

В то же время статистически достоверные различия в содержании МВ были выявлены в группах с различной продолжительностью бесплодия. Так в ФЖ женщин с бесплодием > 6 лет регистрировалось более высокое содержание МВ (табл. 3): AnnV⁺ (в 2,4 раза), AnnV⁺CD45⁺ (в 2,2 раза), AnnV⁺CD206⁺ (в 1,6 раза), AnnV⁺CD14⁺ (в 2,2 раза) по сравнению с группой с бесплодием 3–6 лет. Данная связь, вероятно, обусловлена усилением апоптотических процессов на фоне длительного воспаления и гормональных дисфункций.

Далее, учитывая факт снижение фолликулярного резерва с возрастом, исследовали содержание МВ в группах женщин с различным уровнем антимюллерового гормона (АМГ): с низким (<1,0 нг/мл; группа 1), средним (1,0–6,0 нг/мл; группа 2) и высоким (> 6,0 нг/мл; группа 3) уровнем гормона (табл. 4).

Анализ данных показал, что содержание AnnV⁺, AnnV-CD206⁺, AnnV-CD14⁺ в ФЖ у женщин с наиболее низким уровнем АМГ было в 1,7 раз достоверное выше, чем в группе с высоким уровнем гормона. Вероятно, макрофаги с супрессорной активностью, локализующиеся в клетках теки растущих фолликулов, способны оказывать на них модулирующее действие.

Таблица 3

Содержание микровезикул в фолликулярной жидкости у женщин с разной продолжительностью бесплодия

Параметры	Длительность бесплодия (лет)				
	МВ (мкл)	< 3 (n=7)	3 - 6 (n=11)	> 6 (n=14)	P _u
AnnV ⁻		159,3±22,9 150,9 (116,9-188,9)	180,8±22,3 184,2 (144,9-236,4)	255,8±36,8 215,7 (179,7-264,5)	₁₋₂ =0,52 ₁₋₃ =0,08 ₂₋₃ =0,11
AnnV ⁺		25,9±3,7 30,7 (17,9-32,3)	16,5±3,2 12,8 (8,3-22,9)	38,3±7,5 31,3 (15,7-53,1)	₁₋₂ =0,07 ₁₋₃ =0,27 ₂₋₃ =0,02
AnnV ⁻ CD45 ⁺		66,3±12,9 57,2 (49,7-73,7)	86,6±12,3 92,2 (62,1-125,2)	113,6±19,1 84,6 (78,1-120,8)	₁₋₂ =0,29 ₁₋₃ =0,10 ₂₋₃ =0,26
AnnV ⁻ CD107a ⁺		43,9±7,7 39,2 (26,7-64,2)	44,5±6,9 34,8 (25,5-54,5)	68,9±13,2 84,6 (78,1-120,8)	₁₋₂ =0,96 ₁₋₃ =0,20 ₂₋₃ =0,13
AnnV ⁻ CD206 ⁺		76,5±14,6 62,4 (58,9-82,9)	95,9±12,5 95,3 (68,5-120,7)	136,8±22,3 109,6 (85,4-141,9)	₁₋₂ =0,33 ₁₋₃ =0,08 ₂₋₃ =0,14
AnnV ⁻ CD14 ⁺		127,5±20,2 123,7 (97,1-150,4)	151,7±19,0 153,2 (117,4-206,4)	222,7±33,0 200,3 (157,2-230,1)	₁₋₂ =0,41 ₁₋₃ =0,06 ₂₋₃ =0,09
AnnV ⁺ CD45 ⁺		11,5±1,9 12,8 (6,4-14,7)	8,2±1,9 6,3 (3,2-10,5)	17,6±3,1 13,7 (9,2-27,4)	₁₋₂ =0,27 ₁₋₃ =0,21 ₂₋₃ =0,02
AnnV ⁺ CD107a ⁺		13,6±2,5 12,5 (8,7-16,5)	10,3±2,4 8,7 (4,7-15,2)	21,0±4,6 14,2 (9,2-27,4)	₁₋₂ =0,36 ₁₋₃ =0,29 ₂₋₃ =0,07
AnnV ⁺ CD206 ⁺		11,6±2,5 9,5 (7,9-14,3)	8,2±1,4 8,6 (4,2-10,9)	18,0±3,8 13,9 (9,7-21,7)	₁₋₂ =0,22 ₁₋₃ =0,26 ₂₋₃ =0,03
AnnV ⁺ CD14 ⁺		20,1±3,2 23,0 (12,3-25,6)	12,9±2,5 11,1 (6,4-17,5)	30,9±6,3 24,6 (14,1-38,1)	₁₋₂ =0,09 ₁₋₃ =0,26 ₂₋₃ =0,02

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm S.E.$, медианы, квартильно-диапазона (LQ-UQ); p_u — U-критерий Манна — Уитни.

Выводы

Обнаружено повышение уровня AnnV⁺ и AnnV⁺CD107a⁺ у женщин старшей возрастной группы; а также повышение содержания AnnV-CD107a⁺ у женщин при вторичном бесплодии. В то же время большая длительность бесплодия ассоциировалась с более высоким уровнем МВ: AnnV⁺, AnnV⁺CD45⁺, AnnV⁺CD206⁺, AnnV⁺CD14⁺. При сниженном овариальном резерве регистрировалось более высокое содержание: AnnV⁻, AnnV-CD206⁺ и AnnV-CD14⁺.

Таблица 4

**Содержание микровезикул в фолликулярной жидкости у женщин
с разным уровнем АМГ**

Параметры МВ (мкл)	Уровень АМГ (нг/мл)			P _a
	< 1,0 (n=6)	1-6 (n=24)	>6,0 (n=7)	
AnnV ⁻	239,3±28,5 265,6 (185,9-270,8)	206,8±23,3 181,9 (145,0-235,2)	149,9±19,7 159,5 (101,5-186,9)	1-2=0,51 1-3 = 0,02 2-3=0,24
AnnV ⁺	34,0±6,8 38,5 (17,9-39,4)	28,5±5,1 21,9 (11,8-31,8)	24,6±3,9 21,0 (18,6-34,6)	1-2=0,62 1-3 = 0,24 2-3=0,69
AnnV ⁺ CD45 ⁺	111,0±17,5 118,5 (78,1-138,1)	90,8±11,9 77,2 (57,9-95,1)	74,1±15,1 72,0 (37,6-105,9)	1-2=0,43 1-3 = 0,14 2-3=0,51
AnnV ⁺ CD107a ⁺	63,5±9,9 69,1 (42,7-86,5)	54,0±8,0 42,3 (33,2-62,6)	40,5±6,7 43,9 (23,8-52,3)	1-2=0,58 1-3 = 0,08 2-3=0,42
AnnV ⁺ CD206 ⁺	138,9±15,5 150,8 (132,0-159,7)	104,8±14,1 83,3 (62,2-115,2)	80,4±11,0 89,1 (53,8-95,8)	1-2=0,25 1-3 = 0,01 2-3=0,40
AnnV ⁺ CD14 ⁺	201,9±24,1 220,6 (172,9-232,7)	176,1±21,1 153,8 (116,9-207,0)	123,6±17,4 130,8 (8,2-153,2)	1-2=0,56 1-3 = 0,02 2-3=0,23
AnnV ⁺ CD45 ⁺	16,9±3,5 17,3 (8,3-23,3)	12,6±2,2 10,1 (6,0-14,7)	13,6±3,3 9,4 (7,3-23,3)	1-2=0,37 1-3 = 0,50 2-3=0,82
AnnV ⁺ CD107a ⁺	22,3±4,9 23,2 (9,7-28,7)	14,5±2,9 12,0 (5,9-15,0)	16,4±3,2 13,3 (9,6-25,6)	1-2=0,24 1-3 = 0,32 2-3=0,74
AnnV ⁺ CD206 ⁺	18,6±3,5 20,4 (8,8-25,1)	12,5±2,5 9,5 (5,6-13,9)	13,2±2,9 10,9 (8,9-18,3)	1-2=0,25 1-3 = 0,25 2-3=0,88
AnnV ⁺ CD14 ⁺	27,1±5,5 30,3 (12,3-32,5)	22,3±4,4 16,6 (7,7-24,9)	20,4±3,7 17,7 (13,9-27,8)	1-2=0,60 1-3 = 0,32 2-3=0,82

Примечание. Данные представлены в виде M± S.E., медианы, квартильного диапазона (LQ-UQ); p_a — U-критерий Манна — Уитни.

**ИММУНИЗАЦИЯ РАЗЛИЧНЫМИ АНТИГЕНАМИ
И ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ
АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ МЫШЕЙ ***

**IMMUNIZATION WITH DIFFERENT ANTIGENS AND AUTOBODY
PRODUCTION IN MICE WITH EXPERIMENTAL
AUTOIMMUNE ENCEPHALOMYELITIS**

К. С. Аулова, Г. А. Невинский

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

K. S. Aulova, G. A. Nevinsky

*NSU, Russia
ICBFM SB RAS, Russia*

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

Аннотация

Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, модель рассеянного склероза человека, имеет различные особенности в зависимости от используемой линии мышей и введенного антигена. При иммунизации мышей линии C57BL/6 такими антигенами, как пептид миелин-олигодендроцитарного протеина, комплекс ДНК и гистонов, комплекс ДНК и метилированного сывороточного альбумина наблюдается различный эффект на протеинурию, уровень антител в крови к ДНК, гистонам и белкам миелина, каталитическую активность антител при гидролизе данных субстратов, уровень пролиферации и апоптоза лимфоцитов в различных органах, а также профиль дифференцировки и пролиферации гематопозитических клеток костного мозга.

Abstract

Experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for human multiple sclerosis, has different characteristics depending on a used strain of mice and an injected antigen. In cases of immunization C57BL/6 mice with antigens, such a peptide of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a complex of DNA and histones, a complex of DNA and methylated serum albumin, we have observed different effect on proteinuria, level of antibodies

© К. С. Аулова, Г. А. Невинский, 2018.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10103).

against DNA, histones and myelin proteins, catalytic activity of antibodies in hydrolysis of these substrates, level of lymphocyte proliferation and apoptosis in different organs, and differentiation and proliferation profiles of hematopoietic cells in bone marrow.

Рассеянный склероз (РС) — воспалительное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы, которое характеризуется гетерогенным проявлением. Различные аспекты РС изучают с помощью различных моделей на животных. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЭАЭ) мышей является традиционно используемой моделью заболевания человека, поскольку имеет аналогичные признаки, такие как воспаление, демиелинизация и нейродегенерация в ЦНС. Также, как при ЭАЭ в крови мышей, так и при РС в крови пациентов обнаруживают антитела к ДНК и основному белку миелина (ОБМ). Кроме того, IgG из плазмы мышей с ЭАЭ и больных РС гидролизуют как отдельные белки миелина, так и ДНК. Антитела с каталитической активностью присутствуют в крови больных и другими аутоиммунными заболеваниями. Наличие детектируемого уровня IgG с ДНКазной активностью является одним из ранних признаков протекания аутоиммунных процессов. Также было показано, что при развитии ЭАЭ изменяется профиль дифференцировки и уровень пролиферации гематopoэтических клеток костного мозга, что в сочетании с образованием каталитически активных антител указывает на реорганизацию иммунной системы.

В данной работе рассмотрены три варианта иммунизации мышей линии C57BL/6 для инициации ЭАЭ: с помощью пептида миелин-олигодендроцитарного протеина (МОГ₃₅₋₅₅), комплекса ДНК и метилированного бычьего сывороточного альбумина (ДНК-метБСА), а также комплекса ДНК с гистонами. Иммунизация мышей с помощью МОГ₃₅₋₅₅ приводит к образованию в острую фазу ЭАЭ (7–20 дней) каталитически активных антител, эффективно гидролизующих основной белок миелина, МОГ и ДНК, параллельно со снижением активности IgG, гидролизующих гистоны. По сравнению с МОГ, иммунизация с помощью комплекса ДНК и гистонов приводит к снижению протеинурии, значительному повышению титров антител против ДНК, МОГ и ОБМ, а также каталитических активностей гидролиза данных антигенов. В отличие от МОГ, комплексы ДНК-гистоны и ДНК-метБСА стимулируют образование гидролизующих ДНК антител с длительной поддержкой (15–20 дней). Исходя из полученных данных, иммунизация мышей с помощью комплексов ДНК с метБСА и ДНК с гистонами имеет противоположный по сравнению с МОГ эффект. Иммунизация с помощью комплекса ДНК-гистоны приводит к появлению в острую фазу ЭАЭ каталитических антител, гидролизующих гистоны, в то время как ДНКазную активность IgG

обнаруживают значительно позже. Показано, что иммунизация с помощью МОГ, комплексов ДНК-метБСА и ДНК-гистоны также оказывает различный эффект на уровне апоптоза лимфоцитов в различных органах, профиль дифференцировки и пролиферации стволовых клеток костного мозга.

**ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ
ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ
ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ,
НЕСУЩИХ ЦИАНО-ЕНОНОВЫЙ ФАРМАКОФОР***

IMMUNOMODULATING EFFECT OF SEMISYNTHETIC DERIVATIVES
OF GLYCYRRHETIC ACID BEARING
A CYANO-ENON PHARMACOPHORE

В. О. Бабич, А. В. Марков, О. В. Саломатина,
Н. Ф. Салахутдинов, М. А. Зенкова, Е. Б. Логашенко

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

V. O. Babich, A. V. Markov, O. V. Salomatina,
N. F. Salakhutdinov, M. A. Zenkova, E. B. Logashenko

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

Аннотация

Исследована иммуномодулирующая активность циано-енон-содержащих три-терпеноидов СМ и СГ-199 *in vitro*. Показано, что тритерпеноиды при концентрации 0.5 μM эффективно подавляют фагоцитарную активность и подвижность мыши-ных макрофагов, увеличивают экспрессию провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-1 β); а также обладают антиоксидантной активностью, повышая экспрес-сию HO-1 и уровень GSH и подавляя экспрессию iNOS и продукцию ROS.

Abstract

Immunomodulating activity of cyano-enone-containing triterpenoids SM and SG-199 *in vitro* was studied. It has been shown that triterpenoids at a concentration of 0.5 μM effectively inhibit phagocytic activity and mobility of murine macrophages, in-crease the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β); have antiox-idant activity, leading to an increase in expression of HO-1 and GSH level, as well as a decrease in the expression of iNOS and ROS production.

В настоящее время большие усилия исследователей направлены на со-здание химических производных растительных метаболитов. Одним из

© В. О. Бабич, А. В. Марков, О. В. Саломатина, Н. Ф. Салахутдинов,
М. А. Зенкова, Е. Б. Логашенко, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 17-75-20120.

наиболее перспективных направлений в данной области является введение циано-еновой группировки в тритерпеноидный scaффорд. Показано, что данная модификация приводит к значительному увеличению биологической активности тритерпеноидов [1].

Ранее нами было синтезировано два новых производных глицирретовой кислоты (Рис.1), содержащих в кольце А циано-еновую функциональную группу. На примере СМ было показано, что данное производное характеризуется широким спектром биологической активности — ингибирует пролиферацию опухолевых клеточных линий [2], подавляет рост мышинной карциномы Кребс-2 [3], обладает противовоспалительной активностью на модели грипп-индуцированной пневмонии у мышей [4] и подавляет репликацию вируса гриппа А *in vitro* и *in vivo*.

Целью данного исследования являлась оценка иммуномодулирующего действия циано-енон-содержащих производных глицирретовой кислоты СМ и СГ-199 (рис. 1) *in vitro* на модели мышинных макрофагов.

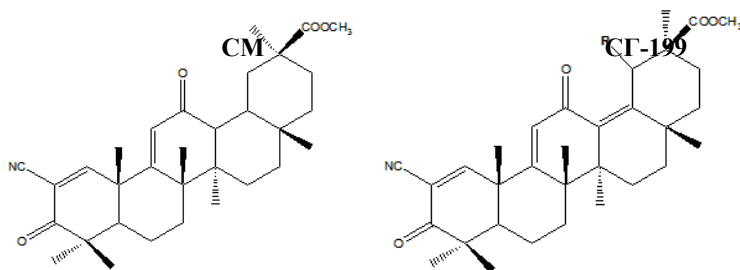


Рис. 1. Структуры производных глицирретовой кислоты

На первом этапе исследований нами был определен диапазон нетоксичных концентраций исследуемых производных глицирретовой кислоты. Для этого клетки инкубировали в среде в присутствии исследуемых соединений в концентрации от 10^{-5} до 10^{-9} М в течение 24 часов. После чего эффект изучаемых соединений на жизнеспособность мышинных макрофагов оценивали с помощью МТТ-теста. Было установлено, что концентрации соединений до 1 μ М не оказывают токсический эффект на клетки (СГ-199: $IC_{50}^{RAW}=2$ мкМ, $IC_{50}^{J774}=1.9$ мкМ; СМ: $IC_{50}^{RAW}=3.5$ мкМ, $IC_{50}^{J774}=2.2$ мкМ). Для дальнейших исследований нами была выбрана рабочая концентрация исследуемых соединений — 0.5 μ М.

Мы исследовали эффект тритерпеноидов на функциональную активность макрофагов, в частности на фагоцитарную активность и подвижность клеток.

Для оценки влияния на фагоцитарную активность производных глицирретовой кислоты, клетки RAW264.7 инкубировали в присутствии соединений в концентрации 0.5 мкМ в течение 24 часов. Фагоцитарную активность оценивали по способности макрофагов поглощать FITC-dextran с помощью проточной цитофлуориметрии. Исследование показало, что соединение СМ в концентрации 0.5 мкМ снижает фагоцитарную активность макрофагов до 47,6 %.

Влияние соединений СМ и СГ-199 на подвижность клеток J774 оценивали *in vitro* методом зарастания царапины («Scratch assay»). Целостность сформированного клетками монослоя нарушали нанесением царапины и отслеживали скорость заполнения царапины макрофагальными клетками в отсутствие соединений (контроль) и в присутствии исследуемых соединений в концентрации 0.1 и 0.5 мкМ. Было показано, что соединения СМ и СГ-199 в концентрации 0.5 мкМ эффективно подавляют миграционную активность клеток J774 (рис. 2).

Влияние на экспрессию цитокинов было исследовано с помощью ПЦР в режиме реального времени. В ходе исследования было показано, что три-терпеноиды оказывают иммуномодулирующий эффект, приводящий к повышению экспрессии провоспалительных цитокинов (ИЛ-6, ФНО- α , ИЛ-1 β), IP-10, COX-2, участвующей в синтезе простагландина E2, а также к снижению противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Было также установлено,

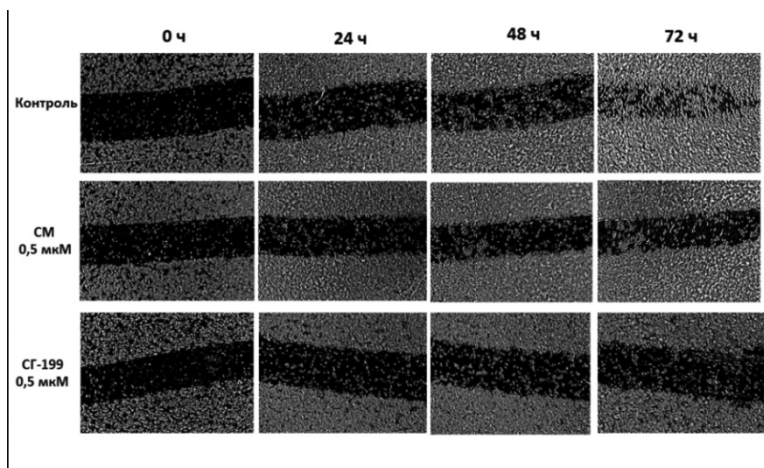


Рис. 2. Оценка влияния производных ГЛК на миграционную активность клеток J774. Клетки J774 инкубировали в присутствии соединений СМ и СГ-199 в концентрации 0,5 мкМ в течение 72 часов. В качестве контроля использовали интактные клетки, инкубированные в отсутствие соединений

что исследуемые производные снижают уровень экспрессии iNOS, что коррелирует со способностью СМ подавлять синтез NO, показанной нами ранее [5]. Выявлено, что исследуемые соединения обладают антиоксидантным эффектом, повышая уровень HO-1, не влияя при этом на уровень экспрессии Nrf2, а также повышая уровень GSH, что взаимосвязано со способностью соединений подавлять выработку ROS мышинными макрофагами.

Таким образом нами было показано, что новые производные глицирревой кислоты, содержащие дополнительную циано-еноновую группировку в кольце А, ингибируют фагоцитарную активность и подвижность мышинных макрофагов, обладают антиоксидантной активностью, а также снижают экспрессию провоспалительных и повышают экспрессию провоспалительных цитокинов.

Литература

1. Markov, A., Zenkova, M., Logashenko, E. Modulation of Tumour-Related Signaling Pathways by Natural Pentacyclic Triterpenoids and their Semisynthetic Derivatives // *Current Medicinal Chemistry*. 2017. Vol. 24. P. 1277–1320.
2. Popadyuk, I., Markov, A., Babich, V., Salomatina, O., Logashenko, E., Zenkova, M., Salakhutdinov, N. Novel derivatives of deoxycholic acid bearing aliphatic or cyclic diamine moieties at the C-3 position: Synthesis and evaluation of anti-proliferative activity // *Bioorg Med Chem Lett*. 2017. Vol. 27. P.3755–3759.
- 3.. Markov, A., Sen'kova, A., Zenkova, M., Logashenko, E. Novel Glycyrrhetic Acid Derivative Soloxolone Methyl Inhibits the Inflammatory Response and Tumor Growth in vivo // 2018. *Molekulyarnaya Biologiya*. Vol. 52, No. 2. P. 306–313.
4. Markov, A., Sen'kova, A., Warszycki, D., Salomatina, O., Salakhutdinov, N., Zenkova, M., Logashenko, E. Soloxolone methyl inhibits influenza virus replication and reduces virus-induced lung inflammation // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7.
5. Salomatina, O., Markov, A., Logashenko, E., Korchagina, D., Zenkova, M., Salakhutdinov, N., Vlasov, V., Tolstikov, G. Synthesis of novel 2-cyano substituted glycyrrhetic acid derivatives as inhibitors of cancer cells growth and NO production in LPS-activated J-774 cells // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 22. P. 585–593.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ОТВЕТ БУРОГО ЖИРА НА ОЖИРЕНИЕ, ИНДУЦИРОВАННОЕ ДИЕТОЙ, У САМЦОВ И САМОК МЫШЕЙ*

TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF BROWN FAT TO DIET-INDUCED OBESITY IN MALE AND FEMALE MICE

Н. Ю. Балыбина¹, Т. В. Яковлева², Е. Н. Макарова², Н. М. Бажан^{1,2}

¹*Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*

²*Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

N. Yu. Balybina¹, T. V. Iakovleva², E. N. Makarova², N. M. Bazhan^{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*

E-mail: n.balybina@g.nsu.ru

Аннотация

Ожирение — одно из наиболее распространенных заболеваний в развитых странах, оно повышает риск развития многих патологий. До сих пор нет эффективных средств для быстрого и безопасного снижения веса.

Ожирение возникает, когда поступление энергии превышает ее расход. Поступление энергии зависит от потребления пищи, а расход, от многих факторов и, в частности, от термогенеза в бурой жировой ткани. Поэтому одним из способов увеличения расхода энергии является активация термогенеза в буром жире. Известно, что в буром жире фактор роста фибробластов 21 (FGF21) активирует термогенез и повышает экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию термогенеза и углеводно-жирового обмена [1, 2]. Однако до сих пор не изучены половые различия в изменении экспрессии FGF21 в буром жире при ожирении. В нашем исследовании мы обнаружили признаки резистентности к FGF21 при ожирении у самцов, но не у самок.

Abstract

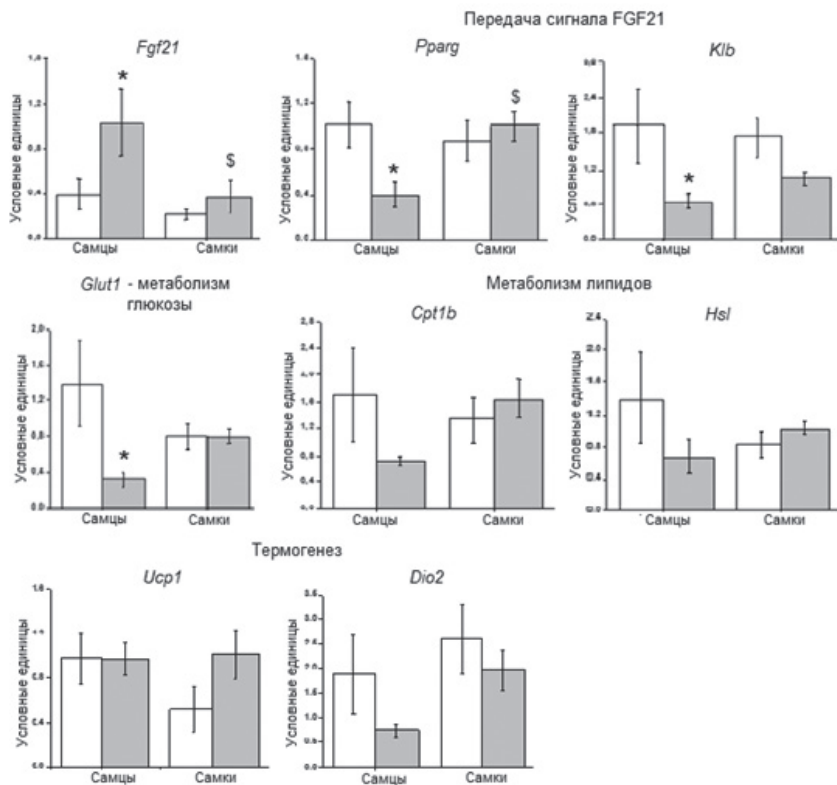
Obesity is one of the most common diseases in developed countries; it increases the risk of many diseases. Until now, there are no effective approaches for rapid and safe weight loss.

Obesity occurs when the energy intake exceeds its expenditure. Energy intake depends on food intake; energy expenditure depends on many factors and, in particular, on thermogenesis in brown adipose tissue. Therefore, activation of thermogenesis in brown fat is one of the way to increase energy consumption. Fibroblasts growth factor 21 (FGF21) is known to activate thermogenesis and increases the expression of genes involved in the regulation of thermogenesis and carbohydrate-fat metabolism in brown fat [1,2]. However, sex differences in the change in the expression of FGF21 in brown fat in obesity have not yet been studied. In our study, we found signs of resistance to FGF21 for obesity in males, but not in females.

Ожирение — одна из наиболее значимых проблем в развитых странах, оно повышает риск развития сахарного диабета второго типа, болезней сердечно-сосудистой системы и опорно-двигательного аппарата, безалкогольной жировой болезни печени и др. До сих пор не разработано эффективных методов лечения данного расстройства, способствующих быстрому, эффективному, а главное безопасному снижению веса.

При ожирении нарушается баланс между поступлением и расходом энергии. Поступление энергии зависит от потребления пищи, а расход, от многих факторов и, в частности, от термогенеза в бурой жировой ткани. Поэтому одним из потенциально возможных способов эффективно и безопасно избавиться от лишнего веса является повышение активности бурой жировой ткани, что позволит увеличить расход энергии и снизить запасы питательных веществ. Известно, что в буром жире фактор роста фибробластов 21 (FGF21) активирует термогенез и повышает экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию термогенеза и углеводно-жирового обмена [1,2]. Показано, что интенсивность термогенеза зависит от пола. Однако до сих пор не изучены половые различия в изменении экспрессии FGF21 в буром жире при ожирении. Исходя из вышесказанного целью нашей работы было исследовать влияние ожирения на экспрессию генов бурого жира, участвующих в регуляции термогенеза и углеводно-жирового обмена, у особей разного пола.

В эксперименте были использованы мыши C57Bl с 10-ти недельного возраста. Мыши контрольной группы получали стандартный корм, животных в группах с диет-индуцированным ожирением (ДИО) перевели на сладко-жирную диету, содержащую помимо стандартного корма, сдобное печенье, семена подсолнечника и свежее свиное сало (10 недель). Методом ПЦР в реальном времени мы исследовали следующие гены: FGF21 — активация термогенеза; рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (*Pparg*) и ко-рецептор рецептора FGF21 (*Klb*) — передача сигнала FGF21; переносчик глюкозы 1 (*Glut1*) — метаболизм глюкозы; карнитин-пальмето-



Уровень мРНК генов в буром жире у контрольных мышей (белый столбик) и мышей с диет-индуцированным ожирением (серый столбик). * $P < 0,05$: сравнение с контролем; \$ $P < 0,05$: сравнение с самцами по Fisher *Post-hoc* test

ил трансфераза 1b (*Cpt1b*) и гормон-чувствительная липаза (*Hsl*) — метаболизм липидов; расслабляющий белок 1 (*Ucp1*) и дейодиназа 2 (*Dio2*) — термогенез.

У самцов в большей степени, чем у самок повышался уровень в FGF21 крови и экспрессия его гена в буром жире. При этом у самцов, но не у самок, наблюдались признаки снижения чувствительности к действию FGF21 на бурую жировую ткань: снижение уровня экспрессии генов *Pparg* и *Klb*. Также мы обнаружили у ДИО самцов снижение, относительно контроля, экспрессии гена-мишени FGF21 — *Glut1*, экспрессию которого

в норме он стимулирует [3]. У самцов при ожирении, несмотря на повышенный уровень экспрессии гена FGF21, мы не наблюдали увеличение уровня экспрессии генов, *Cpt1b*, *Hsl*, *Ucp1* и *Dio2*, однако известно, что в норме FGF21 стимулирует их экспрессию (рис. 1.) [4,5]. Эти факты свидетельствуют о снижении чувствительности к FGF21 в буром жире при ожирении у самцов.

В отличие от самцов, у самок не было обнаружено признаков снижения чувствительности к FGF21 на уровне экспрессии генов в буром жире при ожирении, у них достоверно не изменялся уровень экспрессии ни одного из исследованных нами генов.

В настоящее время активно ведутся исследования по применению FGF21 для коррекции ожирения у лабораторных животных. На основании полученных нами результатов мы можем предположить, что самцы будут менее чувствительны, чем самки к лечению ожирения с помощью введения экзогенного FGF21.

Литература

1. Liu X., Wang Y., Hou L., Xiong Y., Zhao S. Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Promotes Formation of Aerobic Myofibers via the FGF21-SIRT1-AMPK-PGC1 α Pathway // Journal of cellular physiology. — 2017. — Vol. 232. — №. 7. — P. 1893–1906.
2. Chen M. Z., Chang J. C., Zavala-Solorio J., Kates L., Thai M., et al. FGF21 mimetic antibody stimulates UCP1-independent brown fat thermogenesis via FGFR1/ β Klotho complex in non-adipocytes // Molecular metabolism. — 2017. — Vol. 6. — №. 11. — P. 1454–1467.
3. Fisher F. M., Maratos-Flier E. Understanding the Physiology of FGF21 // Annual review of physiology. — 2016. — Vol. 78. — P. 223–241.
4. Douris, N., Desai, B. N., Cisu, T., Fowler, A. J., Zarebidaki, E., et al. Beta-adrenergic Receptors are Critical for Weight Loss but not for other Metabolic Adaptations to the Consumption of a Ketogenic Diet in Male Mice // Molecular Metabolism. — 2017. — Vol. 6. — №. 8. — P. 854–862.
5. Chau M. D., Gao J., Yang Q., Wu Z., Gromada J., et al. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK–SIRT1–PGC-1 α pathway // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2010. — Vol. 107. — №. 28. — P. 12553–12558.

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ
МОЗГА ВЗРОСЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ НЕОНАТАЛЬНОГО
ВВЕДЕНИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ И ДЕЙСТВИЯ
ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА ***

**SEROTONERGIC GENES EXPRESSION
IN THE ADULT RAT BRAIN AFTER NEONATAL
GLUCOCORTICOIDS AND CHRONIC STRESS***

К. В. Балык^{1,2}, Е. В. Сухарева^{1,2},
Д. А. Ланшаков¹, Т. С. Калинина^{1,2}

¹ *Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН*

² *Новосибирский государственный
научно-исследовательский университет*

K. V. Balyk^{1,2}, E. V. Sukhareva^{1,2}, D. A. Lanshakov¹, T. S. Kalinina^{1,2}

¹ *Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Russia*

Аннотация

Однократное введение дексаметазона и гидрокортизона на 3 день жизни снижает активность серотонинергической системы мозга взрослых животных, понижая в среднем мозге экспрессию гена ключевого фермента синтеза медиатора — нейрональной триптофангидроксилазы (*tpH2*) в покое и при действии хронического стресса.

Abstract

A single injection of dexamethasone or hydrocortisone to 3-day-old rats significantly decreased *tpH2* mRNA levels, the key enzyme of the serotonin synthesis, in the midbrain of adult rats at rest and after chronic unpredictable stress.

Серотонинергическая система мозга, как свидетельствуют экспериментальные и клинические данные, вовлечена в проявление депрессивных состояний, склонность к которым многократно возрастает в результате неблагоприятных условий протекания раннего онтогенеза. Даже такие слабые стрессорные воздействия, как разлучение с матерью на различные временные интервалы или ухудшение степени материнской заботы в первые дни

жизни, способно привести к развитию аффективных расстройств в дальнейшем. Кроме того, известно, что развитие психопатологий может быть спровоцировано длительным действием стресса уже во взрослой жизни. Какие изменения при этом происходят в экспрессии генов, белковые продукты которых обеспечивают синтез, обратный захват и рецепцию серотонина, остается не ясным.

Исследование уровней экспрессии основных генов серотониновой системы в отделах мозга взрослых животных после неонатального воздействия глюкокортикоидами и действия хронического непредсказуемого стресса явилось целью настоящего исследования.

Для достижения поставленной цели на 3-й день жизни крысам мужского пола линии Вистар однократно вводили один из двух глюкокортикоидных гормонов — дексаметазон (0,2 мг/кг) или гидрокортизон (5 мг/кг). В качестве контрольных групп выступали однопометные интактные животные и животные с введением физиологического раствора. По достижению половозрелого возраста (45 дней) животных подвергали процедуре хронического непредсказуемого стресса на протяжении 15 дней, предъявляя случайную последовательность таких воздействий, как обдув теплым воздухом, наклон клетки, круглосуточный свет, ограничение подвижности, суточное голодание, плавание. Образцы ткани мозга были взяты через 2 ч. и 24 ч. после окончания действия стресса. Уровень экспрессии генов, регулирующих активность серотонинергической системы — ключевого фермента синтеза медиатора — нейрональной триптофангидроксилазы (*tph2*), серотонинового транспортера (*Scl6a4*) и ауторецептора 5-HT_{1A} подтипа (*5ht1a*) определяли с помощью метода ПЦР в реальном времени с использованием технологии Taq-man и рассчитывали по методу $\Delta\Delta C_t$ относительно экспрессии гена домашнего хозяйства — бета-актина.

Неонатальное введение глюкокортикоидов привело к долговременному изменению активности серотонинергической системы — понижению экспрессии гена нейрональной триптофангидроксилазы (*tph2*) в среднем мозге — области основного скопления перикарионов серотонинергических нейронов. Пониженный уровень мРНК гена *tph2* у животных с неонатальным введением гормона сохранялся на фоне хронического непредсказуемого стресса, повышающего уровень мРНК фермента: на уровне тенденции через 2 ч. после стресса, достигая достоверности через 24 ч. после стресса по сравнению с контрольными группами. Профиль изменений экспрессии гена серотонинового транспортера (*Scl6a4*) в стволе мозга у животных с неонатальным введением глюкокортикоидов в целом повторял динамику изменений уровня мРНК *tph2* на протяжении всех экспериментальных процедур. Экспрессия гена основного ауторецептора — *5ht1a* не зависела от

неонатальных гормональных воздействий и повышалась исключительно через 2 ч. после стресса, как в стволе, так и в префронтальной коре головного мозга, через сутки возвращаясь к исходному уровню экспрессии.

В целом в работе впервые установлено долговременное изменение экспрессии генов серотонинергической системы мозга взрослых животных после однократного введения глюкокортикоидов в чувствительный период раннего онтогенеза. Выявленные изменения экспрессии генов серотонинергической системы могут являться причиной отклонений в психоэмоциональном статусе животных после неонатального гормонального воздействия.

**ОТСТАВЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ НЕОНАТАЛЬНОГО
ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА: НАРУШЕНИЕ
КОГНИТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ
МЫШЕЙ И ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
В ГИППОКАМПЕ ***

THE LONG-TERM EFFECTS OF NEONATAL DEXAMETHASONE
TREATMENT: DISTURBANCE COGNITIVE ABILITIES
OF ADULT MALE MICE AND CHANGES
IN GENE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS

У. И. Батлук^{1,2}, К. В. Бурдеева³, А. С. Шулюпова³, Н. П. Бондарь^{1,2}

¹ *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*

² *Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

³ *Новосибирский государственный медицинский университет,
Новосибирск, Россия*

U. I. Batluk^{1,2}, K. V. Burdeeva³, A. S. Shulyupova³, N. P. Bondar^{1,2}

¹ *Institute of Cytology and Genetics of SB RAS, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³ *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

Аннотация

Дексаметазон является синтетическим аналогом глюкокортикоидов (ГК), вырабатываемых организмом в ответ на стресс. Действие стресса или применение таких ГК, как дексаметазон, в ранний период жизни может негативно сказываться на постнатальном развитии мозга: приводит к нарушениям в формировании и сохранении пространственной памяти. Исследование изменения экспрессии генов на уровне всего генома у взрослых животных с неонатальным введением дексаметазона может объяснить механизмы таких отставленных эффектов как нарушение когнитивных способностей.

Abstract

Dexamethasone is a synthetic analogue of glucocorticoids (GC), produced by the body in response to stress. The effect of stress or the use of such GCs, like dexamethasone, in the early period of life can adversely affect postnatal brain development. In our experi-

© У. И. Батлук, К. В. Бурдеева, А. С. Шулюпова, Н. П. Бондарь, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке проектом Российского научного фонда 16-15-10131.

ment, it was shown, that neonatal dexamethasone administration leads to disturbances in the learning abilities and spatial memory. A study of changes in gene expression on whole genome level in adult animals with neonatal dexamethasone treatment may explain the mechanisms of such delayed effects as cognitive impairment.

Методы

Введение дексаметазона проводили в течение первых трех дней после родов один раз в день с уменьшением дозы (0,5, 0,3, 0,1 мг / кг соответственно). Нами было исследовано влияние дексаметазона как в раннем периоде жизни — на неонатальные рефлексы особей, так во взрослом возрасте — на поведение и экспрессию генов в гиппокампе. Экспрессия генов была оценена с помощью РНК-seq.

Результаты

Введение дексаметазона в ранний период жизни приводит к задержке нейромоторного развития, характеризующегося сохранением незрелых двигательных паттернов, а также к задержке проявления некоторых физиологических параметров — появления шерсти и открытия глаз. Кроме того, введение дексаметазона вызывает задержку в приросте веса животных. Взрослые самцы мышей с введением дексаметазона показали снижение тревожности, а также нарушение пространственной памяти и обучения в водном лабиринте Морриса. Анализ изменений транскриптома взрослых животных с историей введения дексаметазона в раннем возрасте выявил изменение экспрессии 12-ти генов. Среди них были выявлены гены, участвующие в процессах сплайсинга (*Cpsf6*, *Srsf2*), вовлеченные в процессы метаболизма глюкозы и гликогена (*Gck*, *Amy1*), 5 некодирующих РНК, функция которых не изучена, ген, участвующий в процессах расщепления глицина (*Amt*), и ген, вовлеченный в процесс в регуляции транскрипции (*Ankzf1*). Особый интерес представляет гена *Arc*, экспрессия которого была увеличена у мышей с введением дексаметазона. Функция этого гена тесно связана с образованием долговременной памяти, а также с регуляцией синаптической пластичности, и нарушение его экспрессии может вызывать наблюдаемые изменения когнитивных функций.

Заключение

Наше исследование показало, что неонатальное введение дексаметазона оказывает неблагоприятное воздействие на когнитивные способности взрослых самцов мышей. Однако анализ изменений транскриптома гиппокампа этих животных выявил лишь слабые изменения отдельных генов, возможно задействованных в реализации отставленных эффектов дексаметазона.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ
ЭНТЕРОАГРЕГАТИВНЫХ *E. COLI* ПО ДАННЫМ
ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ**

**STUDY OF THE PROPERTIES OF ISOLATES OF ENTEROAGGREGATIVE
E. COLI BY THE COMPLETE GENOMIC SEQUENCE DATA**

Д. С. Болдырева^{1,2}, А. А. Кечин^{1,2}, М. А. Макарова³,
Л. А. Кафтырева³, С. Г. Щербак^{4,5}, С. В. Апалько⁵, М. Л. Филипенко^{1,2},
А. М. Сарана^{4,5}, М. А. Чурина^{5,6}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера*

⁴ *Санкт-Петербургский государственный университет*

⁵ *СПб ГБУЗ «Городская больница № 40*

Курортного административного района»

⁶ *СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница
им. С. П. Боткина»*

D. S. Boldyreva^{1,2}, A. A. Kechin^{1,2}, M. A. Makarova³, L. A. Kaftyreva³,
S. G. Scherbak^{4,5}, S. V. Apalko⁵, M. L. Filipenko^{1,2}, A. M. Sarana^{4,5},
M. A. Churina^{5,6}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

² *Novosibirsk State University*

³ *Saint-Petersburg Pasteur Institute*

⁴ *Saint-Petersburg State University*

⁵ *St. Petersburg State Medical Academy «City Hospital
No. 40 of the Resort Administrative District»*

⁶ *St. Petersburg Clinical Infectious Diseases Hospital
named after S. P. Botkin*

Аннотация

Целью работы стало исследование свойств 8-ми изолятов энтероагрегативных *E. coli* (*EAggEC*), выделенных от детей с дисбиозом кишечника, с использованием дан-

ных полногеномного секвенирования. В среднем, все изоляты несли по 12 генов, кодирующих факторы вирулентности. Генов, кодирующих шига-тоскины, найдено не было. По отношению к стандартным культуральным и фенотипическим методам характеристики полногеномное секвенирование показало высокую информативность для поиска детерминант резистентности к лекарственным препаратам, а также для прогноза вирулентности по наличию соответствующих генов.

Abstract

The aim of the work was to study the properties of 8 isolates of enteroaggregative *E. coli* (*EAggEC*) extracted from children with intestinal dysbiosis using full genome sequencing data. On average, all isolates carried 12 genes encoding virulence factors. There were no genes encoding shiga-toxins. With respect to standard culture and phenotypic characterization methods, full genome sequencing has shown high information value for the search for drug resistance determinants, as well as for prognosis of virulence by the presence of appropriate genes.

Энтероагрегативные *E. coli* (*EAggEC*) являются возбудителями таких кишечных заболеваний, как острая и хроническая диарея, воспаление кишечника у детей и взрослых, дефицит роста у детей. *EAggEC* являются одними из наиболее частых возбудителей внутрибольничных инфекций, часто приводя к гибели пациентов в детских инфекционных и акушерских отделениях. Изоляты *EAggEC* характеризуются наличием широкого спектра факторов вирулентности и резистентностью к стандартному спектру антибиотиков.

Целью нашей работы стало определение свойств изолятов *EAggEC*, выделенных от детей с диагнозом «дисбиоз» кишечника на основе данных полногеномного секвенирования.

Нами были исследованы 8 штаммов *E. coli*, выделенных от детей в возрасте до 2 лет с диагнозом «дисбиоз кишечника». Штаммы были идентифицированы как *EAggEC*, имели различия по ферментации лактозы и сахарозы, подвижности и гемолитической активности.

Определение последовательностей геномов изолятов было проведено с помощью высокопроизводительного секвенирования (NGS) на приборе MiSeq (Illumina) с использованием реагентов MiSeq reagent kit v2 (500 циклов). Библиотеки были приготовлены путём фрагментации геномной ДНК и отбора фрагментов со средней длиной около 500–600 п.о. с последующим присоединением адаптеров с помощью лигирования.

Фенотипическую резистентность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом. Выявление генов лекарственной резистентности в полученных геномных последовательностях осуществляли программой ResFinder.

Факторы вирулентности были определены путём выявления генов вирулентности *EAggEC* (*aaf*, *aggR*, *pet* и др.) с помощью ПЦР в мультиплексном формате с последующей электрофоретической детекцией, а также программным обеспечением VirulenceFinder, проводящим поиск соответствующих последовательностей в геномных последовательностях.

Наиболее часто изоляты были устойчивы к β -лактамам (6 изолятов), аминогликозидам (6 изолятов) и сульфаниламидам (5 изолятов). В большинстве случаев (29 из 34), результаты, полученные анализом данных полногеномного секвенирования, совпадали с результатами диско-диффузионного теста, даже в случае низкого среднего покрытия референсного генома, что говорит о применимости NGS для исследования бактериальных изолятов на устойчивость к антибактериальным препаратам.

Программой VirulenceFinder в среднем было найдено 12 (от 5 до 18) факторов вирулентности для каждого изолята. Наиболее часто встречались гены, кодирующие факторы вирулентности, такие как *aar* (кодирует дисперсин, 7 изолятов) и *ORF4* (6 изолятов). Гены, кодирующие токсины, *astA* и *sat*, встретились в геномах трёх и двух изолятов, соответственно. Гены, кодирующие шига-токсины найдены не были. При сравнении с данными ПЦР результаты совпадали в 88 % случаев (35 из 40).

Таким образом, среди восьми исследуемых изолятов, не было выявлено особо опасных, несущих гены шига-токсинов, однако были найдены изоляты с другими токсинами (первоначально не анализировавшиеся с помощью классического ПЦР), а также изоляты с широким спектром устойчивости к антибиотикам.

**АКТИВАЦИЯ МИКРОГЛИИ КОРЫ НА ФОНЕ
ИНФИЦИРОВАНИЯ НЕ НЕЙТРОПНЫМ
ВИРУСОМ ГРИППА A(H1N1) A/ TOMSK/13/2010 ***

CEREBRAL CORTEX MICROGLIA ACTIVATION DURING
INFECTION WITH THE NON-NEUROTROPIC
A/TOMSK/13/2010 H1N1 INFLUENZA VIRUS

П. И. Гайнутдинов, А. В. Слепнева,
О. Г. Курская, П. М. Кожин, А. В. Ковнер

*ФГБНУ Научно-исследовательский институт экспериментальной
и клинической медицины структурное подразделение ФИЦ ФТМ*

P. I. Gainutdinov, A. V. Slepneva, O. G. Kurskaya, P. M. Kozhin, A. V. Kovner

RIECM, Russia

E-mail: pg@centercem.ru

Аннотация

Помимо повреждения респираторного тракта, острая вирусная инфекция в организме человека может обусловить развитие повреждения центральной нервной системы в виде менингита, энцефалита, менингоэнцефалита (Fuchigami T. et al., 2012) с развитием неврологической симптоматики в виде прогрессирующей энцефалопатии сочетающейся выраженной цефалгией, а так же комы на фоне нарастающего отека мозга, вплоть до летального исхода (Ekstrand J. J., 2012). Эти симптомы характерны для вирусного инфекционного процесса обусловленного разными штаммами вируса гриппа A/H1N1 (Idehara R., 2012). Механизмы индукции повреждения различных структур головного мозга являются спорными: с одной стороны они могут быть связаны с первичной реакцией клеток в ответ на присутствие вируса в ткани ЦНС, а с другой, являться результатом системного иммунного ответа, вторичного, по отношению к инфекционному агенту (Mukherjee A. et al., 2011). Таким образом, при инфицировании сезонным вирусом гриппа A/H1N1 A/Tomsk/13/2010, не имеющим детектированного нейротропного характера, будут комплексно изучены и уточнены механизмы повреждения коры головного мозга, в том числе степень реализации иммунного ответа клетками ЦНС моноцитарного происхождения (иммунными резидентными клетками). Учитывая, тот факт, что реализация воспаления в тканях

© П. И. Гайнутдинов, А. В. Слепнева, О. Г. Курская, П. М. Кожин, А. В. Ковнер, 2018.

* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00257.

ЦНС является основой генерации и прогрессирования ряда нейродегенеративных нарушений, эти результаты подчеркивают значимость способности вирусов гриппа инициировать и пролонгировать воспаление в структурах головного мозга.

Abstract

In addition to respiratory damage, acute viral infection in the human body can lead to the development of central nervous system damage in the form of meningitis, encephalitis, meningoencephalitis (Fuchigami T. et al., 2012) with the development of neurologic symptoms in the form of progressive encephalopathy combined with severe cephalgia, as well as coma against the backdrop of increasing brain edema, up to a lethal outcome (Ekstrand J.J., 2012). These symptoms are typical for the viral infectious process caused by different strains of the influenza A/H1N1 virus (Idehara R., 2012). Mechanisms of various structures of the brain damage induction are controversial: on the one hand, they can be associated with the primary response of cells due to the presence of the virus in the CNS tissue, and on the other, result from a systemic immune response secondary to the infectious pathogen (Mukherjee A. et al., 2011). Thus, infection with the seasonal influenza A/H1N1 A/Tomsk/13/2010 virus, which does not have a detectable neurotropic character, will comprehensively study and refine the mechanisms of cerebral cortex damage, including the degree of realization of the immune response by CNS cells of monocytic origin (immune resident cells). Considering the fact that the realization of inflammation in the CNS tissues is the basis for the generation and progression of a number of neurodegenerative disorders, these results emphasize the importance of the ability of influenza viruses to initiate and prolong inflammation in the structures of the brain.

Вирус гриппа принадлежит к семейству Orthomyxoviridae (Wang G. et al, 2016) и подразделяется на три типа (А, В и С), из которых А и В являются клинически наиболее значимыми. Поражение ЦНС во время гриппозной инфекции включает в себя множество синдромов, описываемых как у детей, так и у взрослых (Nicholson K. G., 1998). Основными клиническими проявлениями являются энцефалиты или энцефалопатии. Воспаление является основополагающим компонентом разнообразного ряда нейродегенеративных заболеваний и связанных с ними невропатологий. Оценка состояния тканей фронтальной и соматосенсорной коры при инфицировании сезонным вирусом гриппа А/Н1N1 позволит составить картину общего состояния нервной ткани и оценить вероятные последствия их повреждения (Locuratolo N. et al., 2012; Raha S., Udani V., 2012). На данный момент существует все больше доказательств того, что микроглия является ключевым фактором нейровоспаления (Block M. L. et al., 2007). Активация микроглии присутствует при различных нейродегенеративных заболеваниях, и тесно связана с патологией. Активация микроглии может одновременно инициировать дополнительную активацию апоптотических стимулов в нейронах и усиливать постоянное повреждение нейронов, указывая, что микроглия

может иметь решающее значение для этиологии и прогрессивного характера нейродегенеративных заболеваний (Baburamani A. A. et al., 2014; López González I. et al., 2016; Sasaki A., 2017). Sadasivan с коллегами показали, что при интраназальном инфицировании неадаптированным не нейротропным штаммом A(H1N1) A/California/09 (Sadasivan S. et al., 2015) инфильтрация Т-клетками отсутствовала, следовательно, увеличение количества микроглии было связано с внутренними нейротоксическими факторами и увеличением количества циркулирующих цитокинов (Chen X. X. et al., 2014). Целью данной работы явилось изучение активации микроглии коры мышей линии BALB/с при инфицировании сезонным вирусом гриппа A/H1N1 A/Tomsk/13/2010 без документированного нейротропного характера.

Исследование было проведено на 75 6–8 недельных мышах самцах линии BALB/с. 60 животных были интраназально инфицированы штаммом A/H1N1 A/Tomsk/13/2010 дозой 1МЛД₅₀, 10 животных составили контрольную группу. Образцы легких и головного мозга животных забирались на 1, 3, 6, 10, 14, 21 и 30 сутки после инфицирования (35 — гистологический анализ, 35 — титрование вируса и постановка рт-ПЦР). Для общего патоморфологического анализа использовалась стандартная гистологическая пробоподготовка (Kovner A. V. et al., 20XX), для проведения ИГХ анализа использовался кит SpringBioScience kit HRP-125 с применением специфических первичных антител на антиген вируса гриппа

A (abcam, 1:300), Iba1 (abcam, 1:200), TNF- α (Sony, 1:300), iNOS (SBS, 1:100), TGF β (SBS, 1:100), Arg1 (sigma. 1:200). Окрашивание проводили согласно мануалу производителя. Инфекционный титр вируса для культуры клеток MDCK из гомогенатов легких и коры головного мозга рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и выражали в lgTCID₅₀/мл (Ашмарин И. П., Воробьев А. А., 1962). Для оценки уровня экспрессии ключевых генов активации микроглии проводили рт-ПЦР (Rusanov A. L. et al., 2014). С использованием первичных праймеров TGFB1, TNFA, AIF1, NOS2, ARG2 с нормировкой на ген GAPDH (Биосинтез, Россия).

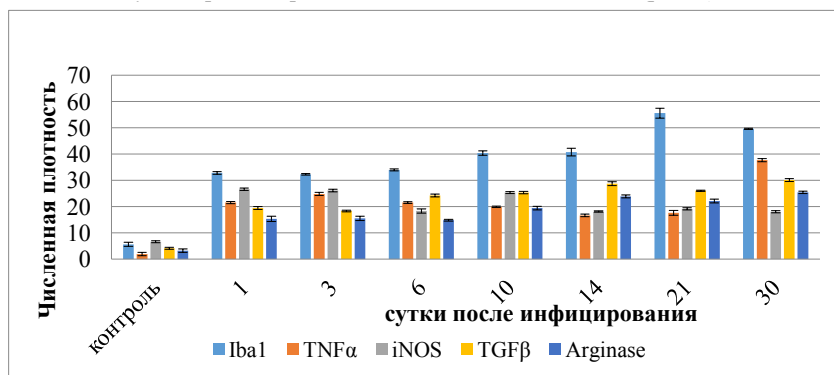
В результате проведенной работы нами было впервые продемонстрировано отсутствие нейротропности для выбранного сезонного штамма вируса гриппа A/H1N1 A/Tomsk/13/2010, что подтверждалось как при титровании вируса на клетки MDCK (см. таблицу), так и при ИГХ-анализе.

Основным патоморфологическим признаком вовлечения центральной нервной системы при сезонном не нейротропном гриппе A/H1N1 являлся деструктивно-отечный синдром, связанный с ранними гемоциркуляторными нарушениями. Данные нарушения сопровождались увеличением численности, активированных Iba1 позитивных клеток микроглии. При морфометрическом анализе гистологических образцов не было детектировано

переключения фенотипа клеток микроглии с провоспалительного на репаративный, что свидетельствует о пролонгированном воспалительном ответе (см. рисунок).

**Титр вируса гриппа A/H1N1 A/Tomsk/13/2010
на культуре клеток MDCK (lgTCID₅₀/мл)**

Орган (n=5)	День после инфицирования			
	1	3	6	10
легкие	4,4 ± 0,89	5,2 ± 0,36	5,6 ± 0,11	4,3 ± 0,26
головной мозг	0	0	0	0



Профиль активации клеток микроглии

При анализе экспрессии ключевых генов активации клеток микроглии, были выявлены повышенные уровни как провоспалительных, так и противоспалительных генов в отличие от работы на другом не нейтропном штамме A/CA/04/2009 A(H1N1) (Sadasivan S. et al., 2015).

В ходе анализа результатов было подтверждено развитие воспаления в коре головного мозга в ответ на первую волну токсинов, выделяемых клетками других висцеральных органов. При этом, репаративные процессы начинаются одновременно с продолжающимся повреждением структур коры головного мозга, что говорит об отсутствии четкой смены фенотипа микроглии. На последние сутки инфицирования должен наступать период реконвалесценции, но в данной работе не наблюдали, ни восстановления разрушенных структур коры головного мозга, ни снижения количества провоспалительных маркеров.

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ
ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
К РАЗЛИЧНЫМ ВИДАМ ХОЗЯЕВ**

**STUDY OF THE MECHANISMS OF ADAPTATION
OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS
TO DIFFERENT TYPES OF HOSTS**

А. В. Гладышева^{1,2}, В. А. Терновой¹, Е. П. Пономарева¹,
Т. П. Микрюкова¹, Е. В. Протопопова¹, А. Н. Швалов¹,
С. Н. Коновалова¹, Е. В. Чаусов¹, В. Б. Локтев¹

¹ *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия*
² *Новосибирский Государственный Университет, Россия*

A. V. Gladysheva^{1,2}, V. A. Ternovoi¹, E. P. Ponomareva¹,
T. P. Mikryukova¹, E. V. Protopopova¹, A. N. Shvalov¹,
S. N. Konovalova¹, E. V. Chausov¹, V. B. Loktev¹

¹ *FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*
² *Novosibirsk State University, Russia*

E-mail: gladysheva_av@vector.nsc.ru

Аннотация

Из головного мозга человека был выделен штамм C11-13 вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), который был пассирован на культурах клеток почек эмбриона свиньи (РЕК), человека (293) и нейроклетках мыши (Neuro-2a). Анализ полного генома полученных вариантов ВКЭ показал, что адаптированный к клеткам ВКЭ приобретает множественные аминокислотные замены, по сравнению с первичным вариантом ВКЭ. Также было обнаружено, что длина 3' UTR изменяется с пассажной историей. Происходит удлинение варибельной части 3' UTR (V3' UTR) со 107 до 144 нуклеотидов. Было произведено сравнение структуры 3' UTR штамма C11-13 с другими, ранее полученными нами 22 штаммами ВКЭ. Установлено, что за варибельность длины главным образом отвечает существенная модификация У-структуры в V3' UTR. Полученные результаты позволяют высказать предположение, что изменение длины V3' UTR принципиально важно для эффективной репликации ТБЕВ в клетках различных хозяев.

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. In addition, it was found that the length 3' UTR changes during passages. It was detected that the length of the V3' UTRs are increased on 107 to 144 nucleotides and whole genomes too. A comparison was made of the structure of 3' UTR strain C11-13 with other previously obtained 22 strains of TBEV. It was established that the length variability there corresponds an essential modification of the Y-structure in V3' UTR. Thus, the obtained results were proposing that the mechanism change of 3' UTR is fundamentally important for effective TBEV replication into cells of different hosts.

В 2013 году из мозга погибшей от энцефалита женщины был выделен штамм C11-13 ВКЭ. Адаптация к клеткам производилась путем серии пассажей на культурах почек эмбриона свиньи (РЕК), человека (293) и нейроклеткам мыши (Neuro-2a). После каждого пассажа производилось секве-

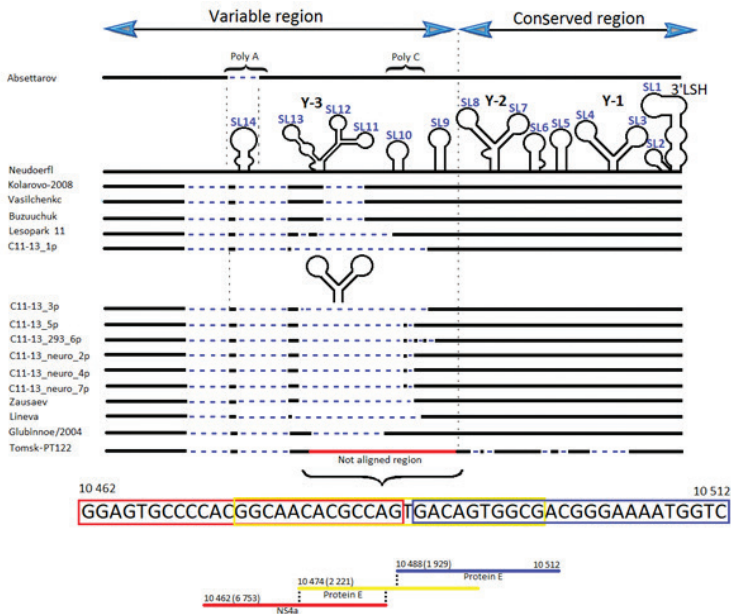


Схема полноразмерного выравнивания нуклеотидных последовательностей 3'UTR ВКЭ

нирование. Анализ полного генома полученных вариантов C11-13 показал, что адаптированный к клеткам штамм C11-13 приобретает множественные аминокислотные замены (8 аминокислотных и 25 нуклеотидных замен), по сравнению с первичным вариантом ВКЭ, а также, было обнаружено увеличение длины вариабельного региона 3' UTR (V3' UTR). С пассажной историей размер V3' UTR изменяется от 107 до 144 нуклеотидов. Нами было произведено полноразмерное выравнивание нуклеотидных последовательностей 3'UTR и построены вторичные структуры 3' UTR РНК. Установлено, что Y-3 структура у штамма C11-13 сформировалась в процессе многократного пассирования на клетках, хотя изначально это была гантелеобразная (DB) структура. Форма Y-3 в целом сохраняется для различных вариантов и штаммов внутри сибирского генотипа, приобретая лишь дополнительные стеблевые петли (SL). Например, у штамма Kolarovo-2008 имеется пять шпилек, вместо двух.

Также, нами было проведено моделирование 3' UTR РНК ВКЭ 22 последовательностей различных штаммов ВКЭ, относящихся к трем основным генотипам. Которое позволило установить, что основную роль в варьировании размеров вирусного генома играет значительная гетерогенность вариабельной области 3' UTR (V3' UTR) ВКЭ, размер которой колеблется от 67 до 446 нуклеотидов. Наиболее разнообразная структура V3' UTR характерна для европейского генотипа ВКЭ. Она представлена двойными Y-образными структурами и 2–4 стеблевыми петлями.

Исключение составил штамм Tomsk-PT122, у которого был обнаружен не выравненный регион (NAR). Из-за дополнительной вставки размер V3' UTR увеличивается до 413 нуклеотидов. NAR в V3' UTR у штамма Tomsk-PT122 полностью сформирован нуклеотидными вставками из кодирующих областей вирусного белка E и NS4a. Предполагаемая схема размещения NAR для 3 гомологичных фрагментов с идентичностью уровня, которая составляет более 70 % от фрагментов гена белка E и NS4a (24–26 нуклеотидов), показана на рис. 1.

Таким образом, наличие найденных делеций и дупликаций в V3' UTR позволяет предположить существование некоторого механизма редактирования 3' UTR ВКЭ. Механизм изменения длины 3' UTR принципиально важен при адаптации ВКЭ к различным видам хозяев и различным природно-климатическим условиям.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
RPN4-ПОДОБНОГО БЕЛКА ИЗ *CANDIDA GLABRATA******STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ANALYSIS
OF RPN4-LIKE PROTEIN FROM *CANDIDA GLABRATA***

Е. Н. Гринева, Д. С. Спасская, Д. С. Карпов

*ФГБУН Институт молекулярной биологии
имени В. А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

E. Grineva, D. Spasskaya, D. Karpov

Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russia

E-mail: drspssk@gmail.com

Аннотация

Белок Rpn4 был впервые идентифицирован в пекарских дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* как фактор транскрипции, отвечающий за координированную регуляцию генов убиквитин-протеасомной системы (1). В ходе биоинформатического анализа было установлено, что гены, кодирующие Rpn4-подобные белки, обнаруживаются только у дрожжей класса *Saccharomycetes* (2). В том числе, ортолог гена *RPN4* был найден у условно-патогенного микроорганизма *Candida glabrata*, родственного пекарским дрожжам. Мы клонировали ген *CGRPN4* из *Candida glabrata*, и показали, что белок CgRpn4 функционально комплементирует делецию собственного гена *RPN4* у *S. cerevisiae*. Кроме того, мы провели делеционный анализ N-концевой области CgRpn4 и показали, что, в отличие от белка *S. cerevisiae*, для его трансактиваторной активности необходимы первые 57 аминокислот, включающие в себя глутамин-богатый участок.

Abstract

Rpn4 protein was first identified in the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a transcription factor required for the coordinated regulation of the ubiquitin-proteasome system genes. Genes encoding Rpn4-like proteins were found only in *Saccharomycetes* yeast. Opportunistic yeast pathogen *Candida glabrata* also has gene encoding Rpn4-like protein. We cloned the *CGRPN4* gene from *Candida glabrata*, and showed that the CgRpn4 protein functionally restores the *RPN4* gene deletion in *S. cerevisiae*. In addition, we performed a deletion analysis of the N-terminal region of CgRpn4 and showed that, in contrast to *S. cerevisiae* protein, its transactivator activity requires the first 57 amino acids, containing the glutamine-rich region.

© Е. Н. Гринева, Д. С. Спасская, Д. С. Карпов, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ №18-34-00704 мол_а.

В ходе биоинформатического анализа установлено, что уровень общего сходства между последовательностями белков CgRpn4 (XP_448300.1, кодируемый геном CAGL0K01727g) и ScRpn4 составляет 48 %. Наибольшее локальное сходство между белками обнаруживается в С-концевой области, где содержится ДНК-связывающий домен типа «цинковые пальцы».

N-концевая область CgRpn4 не имеет значимого сходства с N-концевой областью ScRpn4, содержащей сильный трансактиваторный домен (3).

При этом в N-концевой области CgRpn4 обнаруживается участок, обогащенный остатками глутамина (QRR), который, возможно, входит в состав потенциального глутамин-богатого трансактиваторного домена.

Участок гена CAGL0K01727g, кодирующий предполагаемый ортолог ScRpn4, амплифицировали с геномной ДНК *C. glabrata* штамма HTL (4) и клонировали в дрожжевой низкокопийный вектор Ycp36 под контролем промотора *SCRPN4*. В аналогичный вектор клонировали делеционные формы гена, кодирующие белки с делециями 57, 100 и 177 N-концевых аминокислот.

Активность белков проверяли в штамме *S. cerevisiae* с делецией собственного гена *SCRPN4* по способности восстанавливать сниженную экспрессию гена *PRE1*, кодирующего субъединицу корового комплекса протеасомы — основного протеазного комплекса эукариотических клеток.

Обнаружено, что синтез полноразмерного белка CgRpn4 в мутантном штамме полностью восстанавливает уровень мРНК гена *PRE1* до уровня дикого типа как в нормальных условиях, так и при индукции 4-нитрохиолин-1-оксидом (4-NQO) (рис. 1).

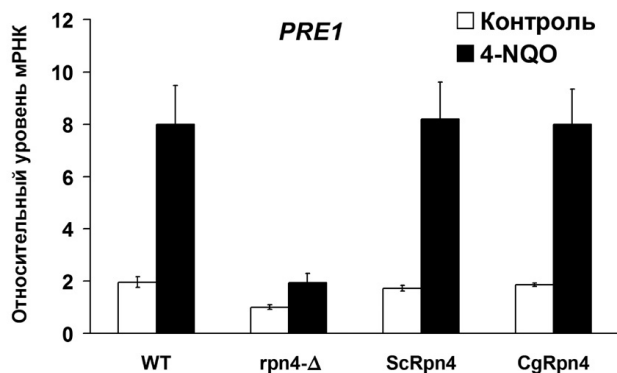


Рис. 1. Делеция гена *RPN4* приводит к снижению экспрессии гена *PRE1*, в то время как синтез с низкокопийной плазмиды как собственного белка *S. cerevisiae* (ScRpn4), так и белка из *C. glabrata* (CgRpn4), восстанавливает уровень мРНК *PRE1* до уровня дикого типа

Путем делеционного анализа белка из *S. cerevisiae* ранее было установлено, что транскрипторную активность ScRpn4 существенно снижает удаление первых 150 N-концевых аминокислот, в то время как удаление 56 и 109 аминокислот незначительно снижает его способность активировать экспрессию мишеней. В то же время для белка из *C. glabrata* обнаружено, что делеция первых 57 аминокислот с N-конца уже значительно снижает экспрессию гена *PRE1* в условиях индукции 4-NQO. Наиболее сильно транскрипторную активность белка снижает делеция 177 N-концевых аминокислот (рис. 2).

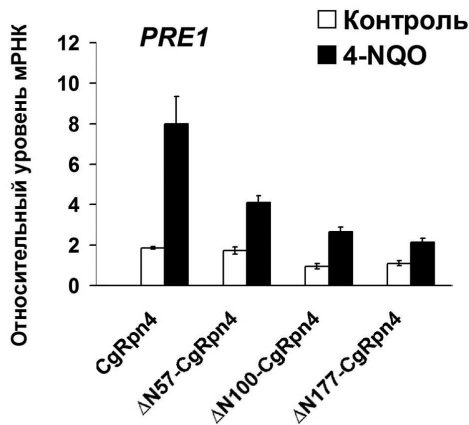


Рис. 2. Делеция первых 57 аминокислот с N-конца CgRpn4 значительно снижает транскрипторную способность белка

По всей видимости, несмотря на отсутствие значимого сходства в N-концевой области с белком ScRpn4, эта область CgRpn4 также содержит сильный транскрипторный домен. В транскрипторную активность CgRpn4 значимый вклад вносят первые 57 аминокислот, содержащие обогащенный остатками глутамин участка. Способность белка CgRpn4 восстанавливать экспрессию протеасомных генов в *S. cerevisiae* говорит о том, что в клетках условно-патогенных дрожжей *C. glabrata* ортолог выполняет ту же функцию, что и у пекарских дрожжей.

Литература

1. Mannhaupt G., Schnall R., Karpov V., Vetter I., Feldmann H. (1999) Rpn4 acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* **450**, 27–34.

2. Mannhaupt G., Feldmann H. (2007) Genomic evolution of the proteasome system among hemiascomycetous yeasts. *J. Mol. Evol.* **65**, 529–540.
3. Karpov D. S., Tutyaeva V. V., Karpov V. L. (2008) Mapping of yeast Rpn4p transactivation domains. *FEBS Letters*. **582**, 3459–3464.
4. Schwarzmuller T., Ma B., Hiller E., Istel F., Tscherner M., Brunke S., Ames L., Firon A., Green B., Cabral V., Marcet-Houben M., Jacobsen I. D., Quintin J., Seider K., Frohner I., Glaser W., Jungwirth H., Bachellier-Bassi S., Chauvel M., Zeidler U., Ferrandon D., Gabaldon T., Hube B., d’Enfert C., Rupp S., Cormack B., Haynes K., Kuchler K. (2014) Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes. *PLoS Pathog.* **10**, e1004211.

ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМОЙ*

STUDY OF NONCODING RNA INVOLVEMENT IN THE FRAGILE X ASSOCIATED DISORDERS

А. А. Дольский

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

A. A. Dolskiy

FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор, Russia

E-mail: dolskiy_aa@vector.nsc.ru

Аннотация

Данная работа посвящена исследованию участия некодирующих РНК в регуляции экспрессии гена *FMRI* у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, синдромом атаксии/тремора, а также синдромом первичной овариальной недостаточности, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.

Abstract

This work is devoted to research the role of noncoding RNA involvement in Fragile X-associated premature ovarian insufficiency, Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome and Fragile X syndrome development.

К заболеваниям, ассоциированным с ломкой X-хромосомой относятся синдромы FXTAS и FXPOI, а также синдром ломкой X-хромосомы, обусловленные экспансией ЦГТ-повтора в 5'-UTR гена *FMRI*, отвечающего за синтез белка FMRP, который принимает непосредственное участие в развитии и правильном функционировании нейронов. При экспансии ЦГТ повтора в количестве от 55 до 200 триплетов аллель гена *FMRI* считается премутацией и встречается крайне часто (1:200 — 1:300 у женщин и 1:250 — 1:450 у мужчин). При этом экспрессия мРНК может увеличиваться, однако количество белка, как правило, снижается или остается на уровне нормы. В данном случае развиваются синдромы FXTAS и FXPOI. В случае дальнейшей экспансии ЦГТ повтора больше 200 единиц, а также

метилирования промоторной области гена *FMR1* развивается синдром ломкой X-хромосомы. Стоит отметить, что проявления симптомов у пациентов с аллелями полной мутации и премутации отличаются, что указывает на разные механизмы патогенеза в обоих случаях. В первом случае — это отсутствие белка FMRP, тогда как механизмы патогенеза синдромов FXTAS и FXPOI остаются неясными. Следует отметить, что характер изменения экспрессии гена *FMR1* при экспансии повторов указывает на участие малых регуляторных некодирующих РНК и механизмов РНК-интерференции в развитии патологии. Возможность участия микроРНК в регуляции экспрессии *FMR1* подтверждается тем, что у носителей премутации только в определенном проценте случаев наблюдаются симптомы, тяжесть которых варьирует от человека к человеку, что может быть связано с балансом мРНК гена *FMR1* и белка FMRP, синтез которого регулируется РНК интерференцией. Также предполагают, что антисенс транскрипт *ASFMR1*, охватывающий область гена *FMR1* и обладающий ГЦЦ повтором является источником микроРНК, комплементарных мРНК гена *FMR1*, что может приводить к подавлению синтеза белка FMRP.

В результате данного исследования не выявлено корреляции между отношением транскрипта *ASFMR1* к уровню мРНК гена *FMR1* и уровнем белка FMRP, что говорит об отсутствии потенциального прямого влияния микроРНК, содержащих ГЦЦ повтор, на активность гена *FMR1*. Проанализирована экспрессия 8 микроРНК и ее корреляция с отношением значений экспрессии мРНК гена *FMR1* и количеством белка FMRP. В результате мы показали, что для одной микроРНК в клеточных линиях с полной мутацией и отсутствием экспрессии гена *FMR1* уровень экспрессии увеличен относительно контрольной группы. Для других микроРНК не выявлена корреляция между их уровнями экспрессии и отношением значений экспрессии мРНК гена *FMR1* и количеством белка FMRP, что вероятно указывает на отсутствие участия данных микроРНК в развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.

**ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА РАННЕГО ОТВЕТА C-FOS
В НЕЙРОНАХ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ
И СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКИХ ЯДЕР СРЕДНЕГО МОЗГА
ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ СУБАНАСТЕТИЧЕСКОЙ ДОЗЫ
КЕТАМИНА В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СТРЕССА ***

EXPRESSION OF C-FOS IN THE NEURONS OF THE PREFRONTAL
CORTEX AND SEROTONINERGIC NUCLEI OF THE FOREBRAIN
AFTER INFUSION OF SUB-ANESTHETIC DOSE OF KETAMINE
IN THE ACUTE STRESS CONDITIONS

У.С. Дрозд^{1,2}, Д. А. Ланшаков¹, Н. Н. Дыгало^{1,2}

¹ *ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН*

² *Новосибирский государственный университет*

U. S. Drozd^{1,2}, D. A. Lanshakov¹, N. N. Dygalo^{1,2}

¹ *FRC Institute of Cytology and Genetics, Siberian Division
of Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia*

² *Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia*

Аннотация

Кетамин, антагонист NMDA рецепторов, в субанастетических дозах оказывает быстрое и стойкое антидепрессантное действие у устойчивых к классическим антидепрессантам пациентов. Однако механизм этого эффекта остается не ясным. В работе исследовано влияние низкой дозы кетамина на активность глутаматергических, ГАМК-ергических и серотонинергических нейронов, оцененной по экспрессии c-Fos, в префронтальной коре, дорсальном и медиальном ядрах шва в условиях острого стресса.

Abstract

Ketamine, an NMDA receptor antagonist, exhibits a rapid and persistent antidepressant activity, at sub-anesthetic doses in treatment-resistant depressed patients and in pre-clinical studies in rodents. The precise mechanisms underlying this activity remain unclear. In this study, the effect of sub-anesthetic dose of ketamine on c-Fos expression in the neurons of the prefrontal cortex, dorsal and medial raphe nuclei has been investigated in the acute stress conditions. Furthermore, it was established whether glutamatergic pyramidal, serotonergic neurons and GABA-ergic interneurons are involved in this response.

© У.С. Дрозд, Д. А. Ланшаков, Н. Н. Дыгало, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ №18-315-00114 мол_а и РНФ № 14-15-00115-П.

Примерно треть пациентов с депрессивными расстройствами не реагирует на существующие антидепрессанты. Поэтому ведется поиск быстродействующих и более эффективных препаратов. Кетамин — антагонист NMDA рецепторов глутамата в низких субанаestheticких дозах в течении нескольких часов ослабляет симптомы депрессии как у людей, так и у животных. Однако механизмы эффектов остаются во многом неясными. Установлено, что префронтальная кора (PFC), в которой экспрессируются NMDA рецепторы, вовлечена в ответ на кетамин. Этот препарат увеличивает высвобождение серотонина в PFC крыс, а проекции PFC в дорзальное ядро (DRN), так же, как и нейроны медиального ядра (MRN) шва, в которых находятся тела серотонинергических нейронов, участвуют в поведенческих ответах на стрессоры, которые, как известно, способны провоцировать формирование депрессивно-подобного состояния. Однако эффекты кетамина на активность серотонинергических нейронов при стрессе остаются неясными. Поэтому в работе исследовали эффекты субанаestheticкой дозы кетамина на активность нейронов, индикатором которой является экспрессия белка раннего ответа c-Fos, в PFC, DRN и MRN при остром стрессе.

Методы

Взрослым самцам крыс линии Wistar внутривенно вводили кетамин (15 мг/кг) или физиологического раствор (контроль). Через час после

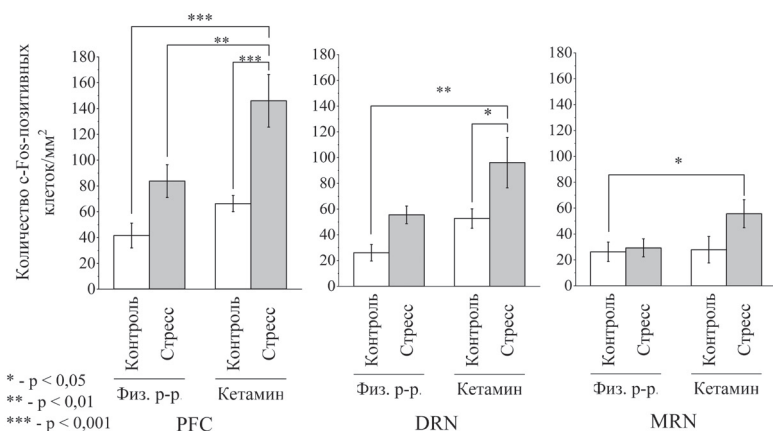


Рис. 1. Изменение общего количества нейронов, экспрессирующих белок c-Fos в префронтальной коре и серотонинергических ядрах среднего мозга после введения субанаestheticкой дозы кетамина и воздействия острым стрессом

введения половину животных каждой группы стрессировали 6 минутным подвешиванием за хвост. Через 2 ч после этого у животных всех групп по общепринятой методике извлекали головной мозг и приготавливали криостатные срезы (16 мкм). Нейроны PFC, DRN и MRN, экспрессирующие анализируемые белки: c-Fos; кальретинин (CR) — маркер ГАМК-ергических интернейронов, Satb2 — маркер пирамидных проекционных нейронов, а в серотонинергических ядрах также их специфический маркер — фермент синтеза этого нейротрансмиттера триптофангидроксилазу 2 (TPH2), выявляли иммуногистохимически. Количество c-Fos- и TPH2-позитивных нейронов, а также нейронов соэкспрессирующих c-Fos и Satb2, c-Fos и CR и c-Fos и TPH2 нормировали на 1 мм² среза. Статистический анализ полученных данных проводили при помощи двухфакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера и считали достоверным при $p < 0,05$.

Результаты

Иммуногистохимическое выявление белка c-Fos показало, что введение субанастетической дозы кетамина вызывает увеличение числа нейронов, экспрессирующих этот белок, в условиях острого стресса. Такая картина наблюдается как в префронтальной коре, так и в дорсальном и медиальных ядрах шва, где расположены тела серотонинергических нейронов. Однако в PFC наблюдается увеличение количества c-Fos-позитивных нейронов по-

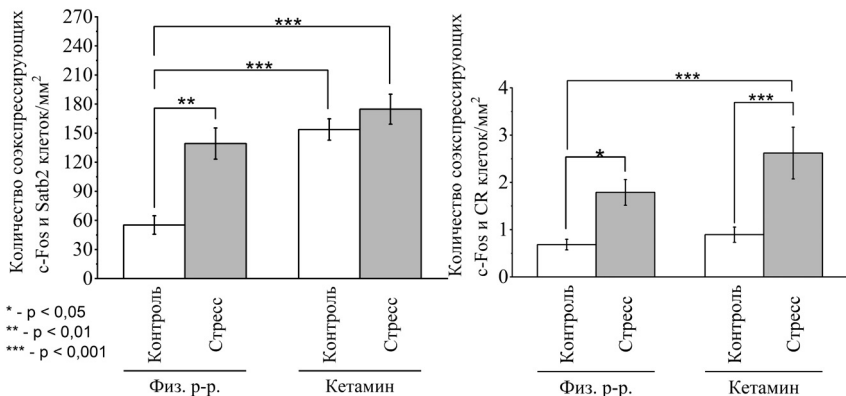


Рис. 2. Изменение количества нейронов, соэкспрессирующих белки c-Fos и Satb2, c-Fos и CR в префронтальной коре после введения субанастетической дозы кетамина и воздействия острым стрессом

сле воздействия острым стрессом, однако введение кетамина значительно усиливает эту реакцию. В отличие от префронтальной коры, в DRN и MRN только совместное воздействие стрессом и кетамином вызывало такой ответ.

В префронтальной коре наблюдалось увеличение количества проекционных нейронов, соэкспрессирующих c-Fos и Satb2 как после воздействия острым стрессом, так и после введения кетамина. С другой стороны, введение субанастетической дозы кетамина не оказало эффекта на уровень экспрессии белка c-Fos в интернейронах, экспрессирующих кальретинин CR, тогда как острый стресс вызывал увеличение белка — маркера активности в этих нейронах.

В медиальном ядре шва воздействие стрессом вызывало увеличение числа нейронов, экспрессирующих TRH2, но введение кетамина предотвращало развитие этой реакции. В дорсальном ядре шва таких изменений не наблюдалось.

В исследованных ядрах шва не наблюдалось никаких изменений в количестве нейронов соэкспрессирующих как c-Fos и CR, так и c-Fos и TRH2, что, возможно, говорит о том, что в наблюдаемое увеличение экспрессии c-Fos в этих областях вовлечены какие-то другие типы нейронов.

Выводы

В совокупности полученные результаты говорят о том, что субанастетическая доза кетамина вызывает увеличение экспрессии белка раннего ответа c-Fos в префронтальной коре и дорсальном и медиальном ядрах шва в условиях острого стресса. Причем в префронтальной коре в этот ответ вовлечены глутаматергические пирамидные нейроны, но не ГАМК-ергические интернейроны, а в изученных ядрах шва ни серотонинергические нейроны, ни ГАМК-ергические интернейроны не вовлекаются в эту реакцию. Кроме того, субанастетическая доза кетамина предотвращает повышение экспрессии TRH2 в медиальном ядре шва, которая вызывается воздействием острым стрессом.

**ИССЛЕДОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ,
ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДНК-ВАКЦИННЫМИ
КОНСТРУКЦИЯМИ, КОДИРУЮЩИМИ ИСКУССТВЕННЫЕ ПО-
ЛИЭПИТОПНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ВИРУСА ЭБОЛА ***

STUDY OF T-CELL RESPONSE IN MICE IMMUNIZED
WITH DNA-VACCINE CONSTRUCTS ENCODING ARTIFICIAL
POLYEPITOPE IMMUNOGENES EBOLA VIRUS

С. Г. Дудко, Д. В. Антонец, Л. И. Карпенко, С. И. Бажан

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

S. G. Dudko, D. V. Antonets, L. I. Karpenko, S. I. Bazhan

*State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo,
Novosibirsk region, Russia*

e-mail: s.g.dudko@gmail.com

Аннотация

На сегодняшний день не существует в достаточной степени эффективной и безопасной вакцины против вируса Эбола. Работа посвящена оценке Т-клеточного иммунного ответа на ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие хелперные и цитотоксические полиэпитопные иммуногены, спроектированные на основе белков вируса Эбола. С помощью метода ICS показано, что иммунизация мышей комбинацией ДНК-вакцин приводит к формированию вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Abstract

Today there is no sufficiently effective and safe vaccine against the Ebola virus. Study is devoted to the evaluation of the T-cell immune response to DNA vaccines constructs encoding helper and cytotoxic polyepitope immunogens, designed from Ebola virus proteins. Using the ICS method, it has been shown that immunization of mice with a combination of DNA vaccines leads to the formation of virus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes.

На сегодняшний день геморрагическая лихорадка Эбола остается одним из самых опасных инфекционных заболеваний. Возбудителем является РНК-геномный вирус Эбола (Ebolavirus), семейство *Filoviridae*, род

© С. Г. Дудко, Д. В. Антонец, Л. И. Карпенко, С. И. Бажан, 2018.

* Исследования выполнены в рамках выполнения государственного задания ГЗ-25/16.

Ebolavirus. Под *Ebolavirus* разделяют на пять видов: *Reston ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Tai Forest ebolavirus*, *Bundibugyo ebolavirus*.

В последние годы наблюдаются некоторые успехи в области разработки профилактических препаратов против вируса Эбола. Описано несколько вакцин потенциально эффективных в борьбе с вирусом в том числе rVSV-ZEBOV, Ad5-ZEBOV, GamEvac-Combi [1–3]. В частности, rVSV-ZEBOV (разработка компании Мерк) с одобрения Всемирной Организацией Здравоохранения использовалась при вспышке 2018 года в Демократической Республике Конго. К сожалению, большинство разрабатываемых вакцин сконструировано на основе генетически модифицированных вирусов, что может явиться причиной нежелательного иммунного ответа на их введение пациенту.

Одним из перспективных направлений является конструирование искусственных полиэпипотпных иммуногенов, представляющих собой комбинацию эпитопов, собранных в единую структуру [4]. В теоретическом отделе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» на основе оригинального программного обеспечения TEpredict [5] и PolyCTLDesigner [6] были сконструированы две рекомбинантные плазмиды, несущие гены, кодирующие искусственные полиэпипотпные цитотоксические и хелперный Т-клеточные иммуногены, соответственно.

Целью данной работы являлось исследование Т-клеточного ответа у мышей иммунизированных полученными ДНК-вакцинными конструкциями против вируса Эбола. Оценка Т-клеточного иммунного ответа на исследуемые вакцины проводилась с использованием метода внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS).

Экспрессия спроектированных генов в составе плазмид оценивали по синтезу специфической мРНК и с помощью иммуноокрашивания трансфицированных клеток. Из клеток линии 293Т, трансфицированных исследуемыми плазмидами, выделяли суммарную РНК и с помощью ОТ-ПЦР получали кДНК с использованием которой, в дальнейшем, проводили ПЦР. Амплифицированные фрагменты соответствовали теоретически рассчитанным. Фрагменты ПЦР, полученные при проведении положительного контроля с использованием в качестве матрицы исследуемых плазмид, оказались аналогичными. Это свидетельствует о наличии специфических мРНК в выделенной из клеток суммарной РНК. Параллельно, клетки, трансфицированные целевыми плазмидами, подвергались иммуногистохимическому окрашиванию. Оценка окрашивания проводилась с помощью антител МАТ 29F2/30A6 к маркерному эпитопу, входящему в состав исследуемых конструкций. Таким образом, было подтверждено, что экспрессия целевых генов идет как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции.

Для оценки иммуногенности вакцинных конструкций использовалась инбредная мышьяная линия BALB/с, которые были разделены на три группы:

1. Мыши, иммунизированные вакциной стимулирующей цитотоксический иммунный ответ (pE-CTL);

2. Мыши, иммунизированные комбинацией из двух вакцин (pE-CTL + pE-Th);

3. Контрольная группа мышей, которым вводился физраствор.

Иммуногенность целевых ДНК-вакцинных конструкций оценивали по их способности индуцировать Т-клеточный ответ у мышей BALB/c через 14 дней после третьей иммунизации.

Выделенные у животных спленоциты стимулировали смесью пептидов (20 мкг/мл каждого пептида), входящих в состав целевых антигенов, после чего проводили их окрашивание флуоресцентными маркерами и анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (производства BD). Величину Т-клеточного иммунного ответа оценивался по продукции цитокинов IFN- γ CD8 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ Т-лимфоцитами.

Полученные с помощью ICS экспериментальные данные были проанализированы с помощью статистического анализа. Достоверность различий между группами была определена с помощью парного теста Уилкоксона. Полученные результаты показали, что статистически значимые отличия от контроля показали IFN γ -продуцирующие CD8 $^{+}$ Т-лимфоциты в группе животных, иммунизированных ДНК-вакциной pE-CTL, а также IFN γ -продуцирующие CD4 $^{+}$ Т-хелперы в группе животных, иммунизированных комбинацией вакцинных конструкций (pE-CTL+pE-Th). Максимальные ответы IFN γ -продуцирующих CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов ($p = 0.063$) и CD4 $^{+}$ Т-клеток ($p = 0.024$), были выявлены в группе животных, иммунизированных комбинацией вакцинных конструкций. Возможно данный эффект обусловлен синергетическим действием CD8 $^{+}$ и CD4 $^{+}$ Т-лимфоцитов.

Таким образом, было показано, что иммунизация мышей комбинацией ДНК-вакцинных конструкций, кодирующих хелперные и цитотоксические полиэпитопные иммуногены, приводит к формированию вирус-специфических CD4 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ Т-лимфоцитов. Следовательно, полученные вакцинные конструкции являются перспективными кандидатами для дальнейших исследований их способности индуцировать цитотоксический и протективный ответы.

Литература

1. Henao-Restrepo A. M., Camacho A., Longini I. M. et al. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *Lancet*. 2017, 389 (10068), 505–518. doi: 10.1016/S0140–6736(16)32621–6.

2. Wu L., Zhang Z., Gao H. et al. Open-label phase I clinical trial of Ad5-EBOV in Africans in China. *Hum Vaccin Immunother.* 2017, 13 (9), 2078–2085. doi: 10.1080/21645515.2017.1342021
3. Dolzhikova I. V., Zubkova O. V., Tukhvatulin A. I. et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum Vaccin Immunother.* 2017, 13 (3), 613–620. doi: 10.1080/21645515.2016.1238535
4. Karpenko L. I. et al. Novel approaches in polyepitope T-cell vaccine development against HIV-1 // *Expert Rev Vaccines.* 2014. Vol. 13, № 1. P. 155–173.
5. Antonets D. V., Maksutov A. Z. [TEpredict: software for T-cell epitope prediction] // *Mol. Biol. (Mosk.).* 2010. Vol. 44, № 1. P. 130–139.
6. Antonets D. V., Bazhan S. I. PolyCTLDesigner: a computational tool for constructing polyepitope T-cell antigens // *BMC Res Notes.* 2013. Vol. 6. P. 407.

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *ADIPOQ*
В ОБРАЗЦАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ РАЗЛИЧНОЙ
ЛОКАЛИЗАЦИИ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ
С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА ***

EXPRESSION OF *ADIPOQ* GENE IN DIFFERENT ADIPOSE DEPOTS
IN CORONARY ARTERY DISEASE PATIENTS

Ю. А. Дылева¹, М. Ю. Синицкий^{1,2}

¹*Научно-исследовательский институт комплексных проблем
сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия*

²*Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН,
Кемерово, Россия*

Y. A. Dyleva¹, M. Y. Sinitsky^{1,2}

¹*Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases,
Kemerovo, Russia*

²*The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry,
Kemerovo, Russia*

E-mail: max-sinitsky@rambler.ru

Аннотация

В данной работе изучена экспрессия мРНК адипонектина (*ADIPOQ*) в адипоцитах, изолированных из образцов подкожной, эпикардальной и периваскулярной жировой ткани 25 пациентов с ишемической болезнью сердца, подвергнутых процедуре аортокоронарного шунтирования. Установлено, что экспрессия гена *ADIPOQ* в адипоцитах варьирует в зависимости от локализации жировой ткани, а также от времени культивирования адипоцитов *in vitro*. Кроме того, показана возможность модификации уровня генной экспрессии адипонектина с помощью розувастатина.

Abstract

The expression of adiponectin (*ADIPOQ*) mRNA in adipocytes isolated from subcutaneous, epicardial and perivascular adipose tissue obtained from 25 patients with ischemic heart disease undergoing coronary artery bypass surgery was studied in this study. It was found that expression of *ADIPOQ* gene changes depending on the localization of adipose tissue, as well as on the time of cultivation of adipocytes *in vitro*. In addition, the possibility of modifying the level of gene expression of adiponectin with rosuvastatin has been demonstrated.

© Ю. А. Дылева, М. Ю. Синицкий, 2018.

* Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-20026).

Накопление сведений о секреторной и эндокринной функции адипоцитов ведет к признанию роли жировой ткани (ЖТ) в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы. Взаимодействие ЖТ с другими тканями и органами осуществляется посредством биологически активных белков — адипокинов. Профиль адипокинов, секретируемых в различных депо ЖТ, существенно различается. Так, висцеральная и подкожная ЖТ (ПЖТ) характеризуются уникальными профилями адипокинов. Особого внимания заслуживает висцеральная ЖТ, конкретные участки которой, расположенные вокруг кровеносных сосудов и сердца (периваскулярная [ПВЖТ] и эпикардальная [ЭЖТ] ЖТ), могут влиять на сердечно-сосудистую функцию миокарда. Секретируемые компоненты данной ЖТ могут непосредственно воздействовать на основную сосудистую сеть и вызывать патологические изменения, такие как утолщение стенок сосудов и образования жировых прослоек, и способствовать образованию атеросклеротических бляшек. Присутствие воспалительных медиаторов в тканях, окружающих эпикардальные коронарные артерии, может приводить к активации сосудистого воспаления, индукции фибротического изменения миокарда, нестабильности атероматозных бляшек и манифестации острых коронарных событий. Таким образом, изучение молекулярно-генетических основ функционирования ЖТ различной локализации может способствовать более глубокому пониманию этиопатогенетических механизмов формирования сердечно-сосудистых патологий и роли ЖТ в их формировании.

Целью данной работы явилось изучение особенностей экспрессии гена *ADIPOQ*, кодирующего один из наиболее распространенных адипокинов — адипонектин — в адипоцитах, изолированных из образцов жировой ткани различной локализации, а также возможности коррекции его экспрессии с помощью ингибиторов ГМГ-КоА редуктазы (статинов).

Материалом исследования послужили адипоциты, изолированные из образцов ПЖТ, ЭЖТ и ПВЖТ, полученных от 25 пациентов НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний с ишемической болезнью сердца (ИБС) в ходе операций аортокоронарного шунтирования.

Изоляция адипоцитов выполнялась по стандартному протоколу, предложенному К. А. Carswell, после чего флотирующая клеточная фракция переносилась в отдельную пробирку с культуральной средой. РНК выделяли с помощью наборов RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen) на нескольких этапах: непосредственно после изоляции адипоцитов (первичное выделение), по истечению 1-х и 2-х суток культивирования в базовой среде, а также после суток культивирования в присутствии розувастатина в двух концентрациях (1 мкг и 5 мкг). РНК хранилась до следующего этапа эксперимента при температуре -70°C . На основе выделенной РНК синтезировали молекулу кДНК с использованием

наборов для обратной транскрипции High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Экспрессию гена *ADIPOQ* оценивали с помощью количественной ПЦР с детекцией продуктов в режиме реального времени с использованием TaqMan зондов. Нормирование результатов проводили по трем референсным генам *HPRT1*, *GAPDH* и *B2M* в соответствии с общепринятыми на настоящий момент рекомендациями. Экспрессию изучаемого гена рассчитывали по Pfaffl-методу и выражали на логарифмической ($\log_{10}$) шкале в виде кратного изменения относительно контрольных образцов.

Адипонектин является одним из наиболее изученных адипокинов в контексте его роли в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Известно, что данный адипокин обладает противовоспалительным и антиатерогенным эффектом, его концентрация в крови снижается у пациентов с инфарктом миокарда, ИБС и атеросклерозом коронарных артерий на фоне увеличения концентрации лептина, которое, в свою очередь, ассоциировано с повышением уровня маркеров воспаления. Отмечено, что продукция адипонектина в различных жировых депо существенно различается. На рис. 1 представлены результаты изучения особенностей генной экспрессии адипонектина в образцах жировой ткани различной локализации, полученных от пациентов с ИБС, а также динамика его экспрессии в зависимости от времени культивирования адипоцитов в базовой среде. За контроль в данном эксперименте была принята экспрессия гена *ADIPOQ* в образцах ПЖТ. В целом экспрессия адипонектина в образцах висцеральной ЖТ была снижена относительно ПЖТ (за исключением суточных культур ЭЖТ, в которых было показано незначительное увеличение экспрессии). Полученные нами результаты по снижению экспрессии адипонектина полностью соответствуют литературным данным и согласуются с ранее полученными нами результатами иммуноферментного анализа, свидетельствующими о снижении секреции данного адипокина в висцеральной ЖТ. Установлено также, что увеличение времени культивирования адипоцитов оказывает влияние на уровень экспрессии адипонектина, приводя к более выраженному его снижению.

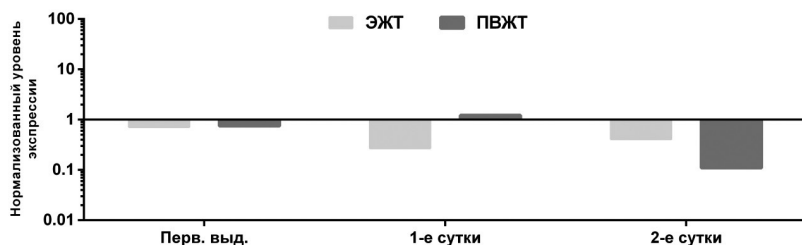


Рис. 1. Экспрессии гена *ADIPOQ* в адипоцитах висцеральной ЖТ

Отдельный интерес представляет проблема коррекции уровня адипокинов с помощью лекарственных препаратов, например, ингибиторов ГМГ-КоА редуктазы (статинов), широко использующихся в терапии ИБС и атеросклероза. Несмотря на то, что ЖТ не является таргетной тканью для статинов, известно большое количество плеiotропных эффектов данных препаратов, не связанных напрямую с их клиническим эффектом. В нашем эксперименте мы оценили способность розувастатина (одного из наиболее часто используемых в клинической практике статинов) модифицировать уровень экспрессии гена *ADIPOQ* адипоцитами, изолированными из ЖТ различной локализации (рис. 2). Установлено, что низкие концентрации данного препарата вызывают более выраженное увеличение экспрессии адипонектина в образцах висцеральной ЖТ, чем высокие концентрации. Данные результаты носят не только фундаментальное, но и прикладное значение, так как адипонектин обладает протективным эффектом в контексте развития сердечно-сосудистых патологий.

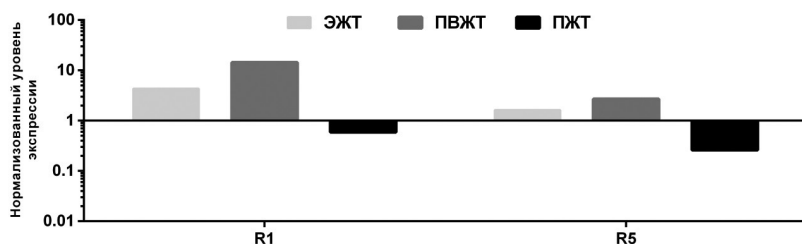


Рис. 2. Экспрессии гена *ADIPOQ* в адипоцитах, культивируемых в присутствии розувастатина

В результате выполненной работы были изучены молекулярно-генетические особенности ЖТ различной локализации, показаны закономерности изменения генной экспрессии адипонектина в зависимости от жирового депо, времени культивирования адипоцитов, а также возможность коррекции ее коррекции с помощью розувастатина.

**АНАЛИЗ УРОВНЯ РНК ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ
С БИОСИНТЕЗОМ ОКСИДА АЗОТА, У КРЫС
С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОМ
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ (НИСАГ)**

**ANALYSIS OF THE RNA RNA OF THE GENES ASSOCIATED
WITH BIOSYNTHESIS OF NITRIC OXIDE IN RATS
WITH INHERITED STRESS-INDUCED
ARTERIAL HYPERTENSION (ISIAH)**

М. А. Журавина^{1,2}, Л. О. Климов^{1,2}, А. Л. Маркель²

¹ *Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»*

² *ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии
и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук» (ФИЦ ИЦиГ СО РАН)*

M.A. Zhuravina^{1,2}, L.O. Klimov^{1,2}, A.L. Markel²

¹ *NSU*

² *FRC «Institute of Cytology and Genetics» SB RAS*

E-mail: Zhuravina.Mashaa@yandex.ru.

Аннотация

Гипертоническая болезнь широко распространена в современном обществе. Она может быть причиной таких осложнений, как инфаркт миокарда и инсульт. Первичная или эссенциальная гипертония рассматривается как многофакторным заболеванием. В то же время, накоплены данные о том, что эндотелиальная дисфункция часто сопровождает артериальную гипертонию. Нарушение эндокринной функции эндотелия может происходить из-за уменьшения биосинтеза NO или окислительного стресса.

Abstract

Hypertensive disease is widespread in modern society. It can be the cause of complications such as myocardial infarction and stroke. Primary or essential hypertension is considered as a multifactorial disease. At the same time, evidences were collected that endothelial dysfunction often accompanies arterial hypertension. Endocrine dysfunction of the endothelium can occur because of the decrease biosynthesis of nitric oxide and oxidative stress.

Введение

Гипертоническая болезнь широко распространена в современном обществе. Она может быть причиной таких осложнений, как инфаркт миокарда, инсульт, сердечная и почечная недостаточность. Первичная или эссенциальная гипертензия рассматривается как многофакторное заболевание. Одним из факторов развития гипертензии является хронический эмоциональный стресс. Линия крыс НИСАГ была получена в ИЦиГ СО РАН и является генетической моделью стресс-зависимой артериальной гипертензии.

Уменьшение биосинтеза оксида азота (NO) в эндотелиальных клетках — это одна из основных причин возникновения эндотелиальной дисфункции. Нарушение функционирования эндотелия в свою очередь может быть одним из возможных механизмов возникновения и развития эссенциальной гипертензии. У крыс линии НИСАГ обнаружена отрицательная корреляция систолического артериального давления (АД) и концентрации NO в плазме крови. В основе этого явления могут лежать механизмы, осуществляющие биосинтез NO.

Оксид азота оказывает вазодилататорный эффект и таким образом участвует в регуляции почечной гемодинамики. Сосудорасширяющий эффект NO также способствует нормализации общего сосудистого тонуса. У крыс линии НИСАГ ранее было показано уменьшение кровотока в ткани почек. У них значительно снижается уровень АД при внутривенном введении нитроглицерина — донора оксида азота. Важным параметром, говорящим об уменьшении биодоступности NO, является концентрация этой активной молекулы в плазме крови. У крыс НИСАГ снижено содержание NO в плазме крови. Уменьшение биодоступности NO может быть связано с уменьшением его биосинтеза или с окислительным стрессом. Таким образом, **целью** нашего исследования является анализ уровня мРНК генов, связанных с биосинтезом NO, у крыс НИСАГ. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Проанализировать данные транскриптомов мозгового и коркового вещества почек крыс линии НИСАГ с целью выявления дифференциально экспрессирующихся генов, связанных с биосинтезом NO. Верифицировать полученные данные с помощью метода ПЦР в режиме реального времени.
2. В стенке артерии мышечного типа крыс линии НИСАГ определить уровень мРНК генов, связанных с биосинтезом NO, методом ПЦР в режиме реального времени и сравнить с этими же показателями у крыс контрольной линии Wistar Albino Glaxo (WAG).

Материалы и методы

Исследования проводились на трехмесячных крысах линий НИСАГ и WAG в качестве нормотензивного контроля. Каждая экспериментальная группа состояла из семи животных. Животные содержались в условиях вивария ИЦиГ СО РАН с неограниченным доступом к корму и воде и двенадцатичасовым световым циклом день/ночь.

В ходе выполнения работы были использованы следующие методы:

1. Выделение тотальной РНК из хвостовой артерии и мозгового вещества почек с помощью трирегента (TRIzol™ reagent) на основе рекомендаций производителя — Ambion, США.
2. ДНКазная обработка с помощью RNase-Free DNase I согласно рекомендациям производителя — Promega.
3. Обратная транскрипция с использованием ревертазы MomiV и рандомизированных олигонуклеотидов N9.
4. Для определения уровня мРНК исследуемых генов проводили количественный анализ с помощью ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе iCycler (Bio Rad laboratories).

Результаты и обсуждение

Биосинтез NO осуществляется NO-синтазой. Она представлена в организме млекопитающих тремя изоформами: нейрональной, индуцибельной и эндотелиальной. Эндотелиальная NO-синтаза (ген *Nos3*) локализована в эндотелии артерий и эпителии почечных канальцев. В нашем исследовании показан сниженный уровень мРНК гена *Nos3* в хвостовой артерии крыс НИСАГ относительно крыс контрольной линии WAG ($p < 0.008$). Также нами был верифицирован сниженный уровень мРНК гена *Nos3* в мозговом веществе почек этих животных ($p < 0.035$). Ранее в лаборатории эволюционной генетики был проведен полный анализ транскриптома мозгового и коркового вещества почек крыс НИСАГ. Изменение уровня транскрипции гена *Nos3* может лежать в основе ранее описанных у крыс линии НИСАГ физиологических нарушений. Хвостовая артерия относится к артериям мышечного типа, обеспечивающим общее периферическое сопротивление сосудов. В мозговом веществе почек локализованы почечные канальцы, в которых осуществляется реабсорбция ионов натрия. Нарушение этих механизмов быть одним из факторов ведущих к повышению уровня базального АД у крыс НИСАГ.

Окислительный стресс также способствует уменьшению биодоступности NO. Дело в том, что активные формы кислорода (ROS) влияют на каталитическую активность NO-синтазы. Под их действием NO-синтаза вместо NO начинает активно синтезировать супероксид-анион. Восстановлению

физиологической функции NO-синтазы способствует дигидрофолат-редуктаза (ген *Dhfr*). Нами был верифицирован сниженный уровень мРНК гена *Dhfr* в мозговом веществе почек крыс НИСАГ ($p < 0.0017$). Таким образом, возможно изменение каталитической активности эндотелиальной NO-синтазы в почках этих животных. Кроме того, супероксид-анион взаимодействует с NO с образованием пероксинитрита.

Признаки окислительного стресса были ранее обнаружены у крыс НИСАГ. Хроническое пероральное введение темпола — миметика супероксид-дисмутазы, крысам линии НИСАГ в молодом возрасте значительно снижает уровень АД у взрослых животных. Также у этих животных снижена концентрация восстановленных тиолов в плазме крови, используемых в качестве маркера окислительного стресса.

В нашем исследовании был обнаружен повышенный уровень мРНК генов, кодирующих антиоксидантные ферменты в хвостовой артерии крыс НИСАГ. Повышен уровень мРНК гена *Sod3*, кодирующего третью изоформу супероксид-дисмутазы, ($p < 0.0027$) и гена *Cat*, кодирующего каталазу, ($p < 0.04$). Нами был верифицирован повышенный уровень мРНК гена *Sod3* ($p < 0.004$) и гена *Gpx2*, кодирующего вторую ихоформу глутатион-пероксидазы, ($p < 0.0017$) в мозговом веществе почек этих животных. Повышенный уровень мРНК генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, в тканях крыс НИСАГ может быть компенсаторным. В то же время, чтобы говорить об окислительном стрессе у этих животных нужно провести анализ не косвенных, а прямых показателей. Главным маркером окислительного стресса является концентрация самих активных форм кислорода.

Выводы

1. Был верифицирован повышенный уровень мРНК генов *Sod3* и *Gpx2* и сниженный — *Nos3* и *Dhfr* в мозговом слое почек крыс НИСАГ.

2. В ткани артерии мышечного типа крыс линии НИСАГ обнаружен пониженный уровень мРНК гена *Nos3* и повышенный уровень мРНК генов *Sod3* и *Cat* относительно крыс контрольной линии WAG. Полученные данные могут свидетельствовать о связи уменьшения биосинтеза оксида азота в почках и артериях с развитием гипертензивного статуса у крыс НИСАГ.

**ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОЕ И ПРОТЕОМНОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ
МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ МАЛЫХ
ЯДРЫШКОВЫХ РНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ***

**WHOLE-TRANSCRIPTOME AND PROTEOMIC STUDY
OF FUNCTIONING OF MODIFIED SMALL NUCLEOLAR RNA
ANALOGUES IN HUMAN CELLS**

Е. С. Журавлев¹, В. О. Шендер², К. С. Ануфриева³,
Д. В. Семенов¹, В. А. Рихтер¹, Г. А. Степанов^{1,4}

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

² *Федеральный научно-клинический центр физико-химической
медицины, Москва*

³ *Институт биоорганической химии им. академиков
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва*

⁴ *Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

E. S. Zhuravlev¹, V. O. Shender², K. S. Anufrieva³,
D. V. Semenov¹, V. A. Richter¹, G. A. Stepanov^{1,4}

¹ *ICBFM SB RAS, Russia*

² *FRCC PCM, Russia*

³ *IBCH RAS, Russia*

⁴ *NSU, Russia*

E-mail: evgenijur@gmail.com

Аннотация

Малые ядрышковые РНК (мяоРНК), наряду с основной ролью в пост-транскрипционной модификации нуклеотидов рибосомных РНК, нередко участвуют в других процессах регуляции экспрессии генов. Более того, некоторые мяоРНК вовлечены в патогенез наследственных и онкологических заболеваний и обнаружены среди форм, циркулирующих в физиологических жидкостях человека. В данной работе при помощи модифицированных аналогов мяоРНК удалось выявить функциональные группы генов, а также специфические кластеры белок-белковых взаимодействий,

© Е. С. Журавлев, В. О. Шендер, К. С. Ануфриева, Д. В. Семенов, В. А. Рихтер, Г. А. Степанов, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке РФФИ 16-04-01414, 16-34-60136.

на которые могут влиять мяоРНК в результате проникновения в клетки человека. Полученные данные позволили предложить молекулярные пути функционирования аналогов мяоРНК в клетках человека.

Abstract

Small nucleolar RNAs (snoRNAs), along with the main role in the post-transcriptional modification of nucleotides of ribosomal RNAs, are often involved in other processes of regulation of gene expression. Moreover, certain snoRNAs are involved in pathogenesis of hereditary and oncological diseases and are found among forms circulating in human physiological fluids. In the current work, using the modified analogues of snoRNA, functional groups of genes, as well as specific clusters of protein-protein interactions, which might undergo the influence of snoRNA in consequence of penetration into human cells, were determined. The obtained data allowed to suggest molecular pathways of functioning of snoRNA analogues in human cells.

Малые ядрышковые РНК (мяоРНК) представляют одну из наиболее многочисленных и хорошо изученных групп некодирующих РНК (нкРНК). В составе рибонуклеопротеидных комплексов мяоРНК регулируют созревание предшественников рибосомных РНК, осуществляя две наиболее распространенные модификации нуклеотидов: представители семейства C/D-бокс-мяоРНК направляют 2'-О-метилирование, а представители семейства H/ACA-бокс-мяоРНК — псевдоуридилирование. Благодаря развитию высокопроизводительных подходов получения и анализа данных, был выявлен ряд неканонических функций мяоРНК, среди которых регуляция альтернативного сплайсинга и трансляции, а также подавление экспрессии генов по механизму подобному действию микроРНК [1]. Более того, изменения в экспрессии и/или локализации определенных мяоРНК наблюдаются при патогенезе некоторых наследственных и онкологических заболеваний [2].

Центральной задачей в рамках данной работы является исследование особенностей функционирования в клетках человека следующих мяоРНК: SNORD25, SNORD35a, SNORD74 — для которых выявлено участие в патологических процессах. В качестве основного подхода был выбран синтез аналогов этих мяоРНК и последующая их трансфекция в клетки человека с регистрацией возникающих изменений при помощи различных методов.

Ранее было установлено, что в клетках MCF-7, трансфицированных немодифицированными аналогами мяоРНК, происходит повышение уровня транскрипции группы генов интерферонового ответа и генов апоптотического каскада, которое характеризует неспецифический иммуностимулирующий эффект РНК [3]. Более того, выявлено, что наличие в структуре аналогов

клеотиды, 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.

Исходя из вышесказанного, в данной работе для подавления неспецифического иммунного ответа была выбрана стратегия включения модифицированных нуклеотидов в состав аналогов мяоРНК. На первом этапе с помощью транскрипции *in vitro* были получены РНК-конструкции с последовательностями природных SNORD25, SNORD35a, SNORD74 C/D-бокс-мяоРНК, содержащие m⁶A, m⁵C и Ψ.

В ходе трансфекции аналогов мяоРНК в клетки человека MCF-7 было установлено, что введение псевдоуридина в структуру коротких нкРНК существенно снижает как иммуностимулирующее, так и цитотоксическое действие РНК-конструкций (рис. 1).

На следующем этапе для выявления специфичных путей функционирования каждой мяоРНК по результатам скрининга клеточных линий была выбрана культура клеток аденокарциномы яичников SK-OV-3, как культура с минимальной активацией системы врожденного иммунного ответа. Трансфицированные Ψ-модифицированными аналогами мяоРНК клетки были проанализированы с помощью двух подходов: метода глубокого секвенирования транскриптома на платформе Illumina NextSeq и метода tandemной масс-спектрометрии, совмещенной с обращенно-фазовой жидкостной хро-

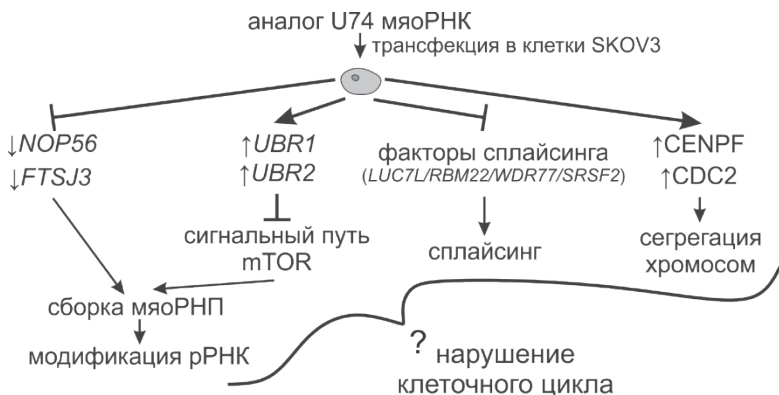


Рис. 2. Гипотетическая схема действия аналога SNORD74 мяоРНК на клетки SK-OV-3 по результатам функционального анализа дифференциальной экспрессии генов и дифференциальной представленности белков

матографией на приборе Q Exactive HF Thermo Fisher Scientific. Анализ совокупности полученных данных позволил предположить возможные молекулярные пути функционирования аналогов каждой из выбранных мяоРНК в клетках человека (рис. 2).

Литература

1. Bratkovič T., Rogelj B. The many faces of small nucleolar RNAs // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. — 2014. — Т. 1839. — №. 6. — С. 438-443.
2. Su J. et al. Analysis of small nucleolar RNAs in sputum for lung cancer diagnosis // *Oncotarget*. — 2016. — Т. 7. — №. 5. — С. 5131.
3. 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.

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПИСТОРХОЗЕ *

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF ANTIOXIDANTS IN THE EXPERIMENTAL OPISTHORCHIASIS

О. Г. Запарина¹, А. В. Ковнер¹, А. Ш. Рахметова²,
М. Ю. Пахарукова^{1,2}, В. А. Мордвинов¹

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

O. Zaparina¹, A. Kovner¹, A. Rakhmetova²,
M. Pakharukova^{1,2}, V. Mordvinov¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

E-mail: zp.oksana.93@gmail.com

Аннотация

Opisthorchis felineus (кошачья двуустка) широко распространенная на территории Европы и Азии трематода семейства Opisthorchiidae, который паразитирует в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих, в том числе и человека, вызывая описторхоз.

Abstract

Opisthorchis felineus (liver fluke) is endemic to the territories of Europe and Asia the trematode of the family Opisthorchiidae, which infests the hepatobiliary system of fish-eating mammals including humans, causing opisthorchiasis.

Opisthorchis felineus (кошачья двуустка) является одним из эпидемиологически значимых представителей трематод семейства Opisthorchiidae, который паразитирует в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих, в том числе и человека, вызывая описторхоз. Ареал *O. felineus* охватывает территории Европы и Азии, однако, основной очаг находится на территории Западной Сибири. Описторхоз сопровождается структурно-функциональ-

© О. Г. Запарина, А. В. Ковнер, А. Ш. Рахметова, М. Ю. Пахарукова, В. А. Мордвинов, 2018.

* Работа поддержана грантом РФФИ №18-15-00098.

ными нарушениями печени, в результате чего возникают холестааз и холецистит, формируются очаги хронического воспаления, вплоть до возникновения предраковых изменений эпителия желчных протоков. Механизмы этих изменений при описторхозе до конца не изучены. Однако, существует гипотеза о возможной роли окислительного стресса в этом процессе. Предполагается, что секреторно-экскреторный продукт *O.felineus*, содержащий белки и низкомолекулярные метаболиты, обладает генотоксичными и проокислительными свойствами, за счет чего может вызывать повреждения ДНК и привести к возникновению предраковых изменений клеток.

Цель: исследовать влияние природного антиоксиданта ресвератрола и митохондриально-направленного антиоксиданта SKQ1 (*10-(6'-Plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium*) на печень и оценить возможную роль окислительного стресса при экспериментальном описторхозе.

С помощью полуколичественного анализа гистологических препаратов, были выявлены структурные изменения в печени, включая воспаление, дисплазию, метаплазию, пролиферацию эпителия желчных протоков, перидуктальный фиброз, холангиофиброз и т. д. Оценены биохимические показатели сыворотки крови, а также оценен уровень экспрессии генов, отвечающих за воспаление и фиброгенез и генов антиоксидантной защиты организма с помощью ПЦР анализа с детекцией в режиме реального времени.

При воздействии антиоксидантов наблюдалось улучшение биохимических показателей печени, снижение степени дисплазии эпителия желчных протоков и снижение маркеров воспаления на фоне экспериментального описторхоза.

Таким образом окислительный стресс играет важную роль в патогенезе описторхоза, по-видимому, опосредуя процессы воспаления и дисплазии желчных протоков.

**ПОЛУЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ
МОЛЕКУЛЯРНЫХ КЛОНОВ CRF63_02A1 ВИЧ-1
С ТРОПИЗМОМ К CCR5 И CXCR4 КОРЕЦЕПТОРАМ ***

CONSTRUCTION OF INFECTIOUS MOLECULAR CLONES
CRF63_02A1 HIV-1 USING CCR5 AND CXCR4 CO-RECEPTORS

Д. П. Зырянова, А. В. Тотменин, Н. В. Богачева, Н. М. Гашникова

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

D. P. Zyryanova, A. V. Totmenin, N. V. Bogacheva, N. M. Gashnikova

FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia

Аннотация

В настоящее время на значительной части Сибирского федерального округа (СФО) преобладающим генетическим вариантом среди ВИЧ-инфицированных лиц является форма CRF63_02A1 ВИЧ-1. R5- и X4-тропные инфекционные молекулярные клоны (ИМК) CRF63_02A1 ВИЧ-1 являются перспективной моделью для решения фундаментальных и прикладных задач.

Abstract

In a significant part of the Siberian Federal District, the predominant genetic variant among HIV-infected persons is CRF63_02A1 HIV-1. R5- and X4-tropic infectious molecular clones CRF63_02A1 HIV-1 can be widely used in basic and applied HIV research.

ИМК ВИЧ-1 представляют собой плазмидный вектор, содержащий нуклеотидную последовательность ВИЧ-1, кодирующую все структурные и функциональные вирусные белки, а также регуляторные области, необходимые для образования патогенных вирусных частиц в культуре эукариотических клеток. Вирусные частицы генетически однородны, их нуклеотидная последовательность известна, что повышает уровень стандартизации и воспроизводимости исследований. Возможность создания целевых модификаций генома ИМК расширяет спектр применения данной модели. В настоящее время актуально получение ИМК на основе генетических вариантов, определяющих эпидемию ВИЧ-1 в России. Одним из таких вариантов является CRF63_02A1, распространенный на территории СФО [2]. ВИЧ-1 изоляты классифицируются на основе их способности использовать CCR5 (варианты R5), CXCR4 (ва-

рианты Х4) или оба корецептора (варианты R5X4) для слияния с клеткой. Тип тропизма ВИЧ-1 является важной характеристикой, поскольку определяет свойства белка gp120 и, как следствие, особенности патогенеза [3]. При культивировании Х4-тропных ВИЧ-1 наблюдается характерный цитопатический эффект в виде синцитиеобразования, тогда как R5-тропные ВИЧ-1 синцитиев не образуют. Целью настоящего исследования было получение Х4-тропного и R5-тропного ИМК CRF63_02A1 ВИЧ-1.

Для получения ИМК из коллекции изолятов ВИЧ-1 отдела ретровирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора выбраны образцы CRF63_02A1 ВИЧ-1 MtBs и T11 с тропизмом к CXCR4 и CCR5 корецепторам соответственно. Тропизм определялся генотипическим методом с использованием базы данных geno-2-feno. Схема получения ИМК T11 описана ранее [1]. ИМК MtBs получен по альтернативной схеме. Проведено выделение провирусной ДНК MtBs из клеток. Методом полимеразной цепной реакции получено два перекрывающих геном фрагмента размерами 6160 и 4224 пар нуклеотидов. Фрагменты генома клонированы в векторах pCR-XL-TOPO Invitrogen. Проведено секвенирование вставок, отобраны варианты наиболее близкие к консенсусной последовательности. Сборка полного генома MtBs проводилась в плазмиде Bluescript по уникальным сайтам рестрикции EcoRI, NotI, NcoI. Выполнена трансфекция ИМК T11 и MtBs в культуру HEK293T с использованием реагента Lipofectamine 2000. На 3 сутки культуральная среда отобрана, проведена через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Проведено измерение концентрации вирус-специфического белка p24 в культуральной среде каждого из образцов методом иммуноферментного анализа (ИФА). Выполнено инфицирование клеточных линий мононуклеаров периферической крови (МПК) и МТ-4 полученными вирусными стоками ИМК T11 и MtBs. Отбор культуральной среды для определения прироста концентрации p24 проводился каждые 3 суток культивирования. Визуально при микроскопии проводилась оценка цитопатического действия вируса. Выявлен значительный прирост концентрации белка p24 в культуральной среде МПК при культивировании ИМК T11 и MtBs, что свидетельствует о получении репликационно компетентных вирусов. В культуре МТ-4 прирост концентрации p24 наблюдался только при культивировании MtBs. Эти данные подтверждают результат генотипического исследования тропизма изолятов T11 и MtBs. При микроскопии МПК и МТ-4, инфицированных ИМК MtBs отмечалось образование синцитиев, характерных для Х4-тропных ВИЧ-1.

Выводы. Впервые получены ИМК CRF63_02A1 ВИЧ-1 с тропизмом к CCR5 и CXCR4 клеточным рецепторам. ИМК могут быть использованы для решения фундаментальных и прикладных задач, таких как изучение биологических свойств вируса, оценка эффективности лекарственных препаратов, вакцин, диагностических систем.

Данная работа проводится в рамках проекта РНФ «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований отдельными научными группами «Создание новых препаратов, ингибирующих интеграцию ВИЧ-1, на основе ген-направленных и антисмысловых олигонуклеотидов»», № 16-15-10238.

Литература

1. Зырянова Д. П., Тотменин А. В., Богачева Н. В., Гашникова Н. М. Получение и возможность использования инфекционных молекулярных клонов CRF63_02A1 ВИЧ-1 // Журнал инфектологии. Материалы V конгресса Евро-азиатского общества по инфекционным болезням. Новосибирск. П. 1. Т. 10 №2, 2018. С. 48–49.
2. Baryshev PB, Bogachev VV, Gashnikova NM (2014) HIV-1 genetic diversity in Russia: CRF63_02A1, a new HIV type 1 genetic variant spreading in Siberia. *AIDS Res Human Retrovir* 30(6):592–597.
3. Schuitemaker H, van't Wout AB, Lusso P. Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J. Transl. Med.* 2011; 9(Suppl. 1):S5. [PubMed: 21284904].

ПОИСК БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА TRIM14*

SEARCH FOR PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS OF HUMAN PROTEIN TRIM14

Г. В. Ковалева

*ФГБУН Институт молекулярной генетики
Российской академии наук*

G. V. Kovaleva

Institute of Molecular Genetics RAS, Russia

E-mail: winter888@bk.ru

Аннотация

TRIM (TRIPartite Motif) 14 — активный участник процессов врожденного иммунитета, играет важную роль в онкогенезе. Однако механизмы его функционирования в клетках до конца не выяснены. Мы поставили своей целью обнаружение ранее неизвестных взаимодействий данного белка с другими белками с помощью метода двухшаговой аффинной очистки (GS-TAP, tandem affinity purification) с последующей масс-спектрометрией. В результате проведенной работы были выявлены несколько белков, взаимодействующих с TRIM14, среди которых кератин 10, кератин 1 и транскрипционный фактор PAX-5.

Abstract

TRIM (TRIPartite Motif) 14 is an active participant in the processes of innate immunity, plays an important role in oncogenesis. However, the mechanisms of its functioning in cells are not fully understood. We aimed to detect previously unknown interactions of this protein with other proteins using the two-step affinity purification (GS-TAP, tandem affinity purification) method followed by mass spectrometry. As a result of the work, several proteins interacting with TRIM14 were detected, among them keratin 10, keratin 1 and transcription factor PAX-5.

Семейство белков TRIM — одно из наиболее исследуемых семейств на сегодняшний день, так как эти белки активно участвуют во множестве важных процессов в клетках, и, в первую очередь, во врожденном иммунном ответе. TRIM14, как и другие члены TRIM семейства, участвует в противови-

русном и противобактериальном иммунном ответе (Zhou et al., PNAS USA, 2014, 111, E245–254; Nenasheva et al., Immunol Res, 2015, 62, 255–262; Wang S. Sci Rep, 2016, 6, 32336; Perelman et al. PLoS Pathog, 2016, 12, e1006102). Существуют данные, указывающие на его влияние на апоптоз и аутофагию (Nenasheva et al., Mol Biol Rep, 2018, 10.1007/s11033–018–4365–7; Chen et al., Mol Cell, 2016, 64(1), 105–119) и на участие в процессах онкогенеза (Zhu et al., Sci. Rep., 2016, 6, 19070; Su et al., Oncotarget, 2016, 7, 9939–9950; Xu et al., Sci. Rep., 2017, 7, 42411).

Было показано, что мышинный гомолог TRIM14 (PUB) взаимодействует с транскрипционным фактором PU.1, который участвует в дифференцировке и пролиферации клеток лимфоидного и миелоидного ряда. При этом подавляется активность PU.1, что приводит к снижению количества зрелых макрофагов, нейтрофилов, Т- и В-клеток (Hirose et al., Biochem Biophys Res Commun, 2003, 311, 351–360). Также, недавно было показано, что активация макрофагов через toll-рецепторы приводит к повышенной регуляции большинства белков TRIM семейства, в том числе и TRIM14 (Jiang MX, Hong X, Sci Rep, 2017, 7, 42781).

TRIM14 располагается на внешней поверхности митохондрий, где он связывается с белком MAVS и при индукции вирусными РНК выступает посредником между транскрипционным фактором NF-κB и MAVS, что способствует антивирусному иммунному ответу (Zhou et al., PNAS USA, 2014, 111, E245–254).

Особое место TRIM14 занимает в хронических процессах при аутоиммунных заболеваниях. Аутоиммунные заболевания могут возникнуть, когда иммунная система особенно остро реагирует на раздражитель, что приводит к выбросу провоспалительных цитокинов и интерферонов I типа. Повышенная экспрессия интерферонов I типа наблюдается при аутоиммунных заболеваниях, таких как системная красная волчанка и синдром Шегрена. Шведские ученые идентифицировали гены семейства TRIM, индуцируемые интерфероном, при синдроме Шегрена, в том числе и TRIM14 (Sjostrand et al., Ann Rheum Dis, 2012, 71, A81). Также, повышенная экспрессия TRIM14 была обнаружена и при изучении псориаза (Roberson et al., J Invest Dermatol, 2012, 132, 583–592).

Для изучения молекулярных механизмов участия TRIM14 в этих процессах нами был осуществлен поиск белок-белковых взаимодействий этого белка с помощью метода аффинной очистки белка, совмещенной с масс-спектрометрией (AP-MS). Двухшаговая аффинная очистка (TAP, tandem affinity purification) представляет собой поэтапное получение белковых комплексов (байтов) с использованием антител к первому тегу. Наиболее совершенный вариант данной системы для клеток млекопитающих был предложен ав-

стрийскими учеными (GS-TAP). В качестве первого тега они использовали два иммуноглобулина G, а второго — стрептавидин-связывающий белок (Bürkstümmer T, Bennett KL, *Nature Methods*, 2006, 3, 1013–1019). Затем байты были разделены с помощью 1D SDS-PAGE и визуализированы окрашиванием серебром. Для идентификации обнаруженных белков далее проводился масс-спектрометрический анализ, который включал: отмывку геля от красителя; трипсинолизис белков; нанесение пептидов на мишень для MALDI масс-спектрометрии.

Мы проводили поиск белков, взаимодействующих с TRIM14 человека, в двух типах клеток HEK293 и HL-60. Была сконструирована плазида для GS-TAP, содержащая последовательность кДНК TRIM14. В случае клеток HEK293 были получены клоны, стабильно экспрессирующие эту плазмиду, в культуре клеток HL-60 была использована транзientная экспрессия. В качестве контроля использовали трансфекцию плазмидой, не содержащей кДНК TRIM14. Полученные в результате GS-TAP белки были разделены с помощью 1D SDS-PAGE и визуализированы окрашиванием серебром. Белковые полосы были вырезаны из геля и проанализированы с помощью метода масс-спектрометрии.

Согласно результатам масс-спектрометрии наиболее достоверно в качестве партнеров TRIM14 в обоих случаях (HEK293 и HL-60) были идентифицированы три белка: кератин (KRT)1, KRT10 и PAX-5. В контроле ни один из этих белков не обнаруживался.

Транскрипционный фактор PAX-5 привлекает в последнее время большое внимание исследователей, что связано, в первую очередь, с его ролью в иммунологических процессах (Busslinger M, *Annu Rev Immunol*, 2004, 22, 55–79). Было также показано, что нарушение его экспрессии связано с возникновением разного типа опухолей (Souabni et al., *Blood*, 2007, 109, 281–289). Кроме участия в злокачественном перерождении клеток, имеются основания предполагать, что PAX-5 играет роль в развитии других патологических процессов, например, в патогенезе бронхиальной астмы (Минев и др., *Мед Иммунол*, 2011, 13, 569–580). Возможное его взаимодействие с TRIM14 открывает новое направление в изучении механизмов его работы.

Кератин второго типа KRT1 и его партнер-гетеродимер первого типа KRT10 образуют основной цитоскелет в кератиноцитах. Их повышенная экспрессия способствует увеличению количества филагтрина и появлению гипервоспаления, как при экземе (Brown SJ, McLean WH., *J Invest Dermatol.*, 2012, 132, 751–762).

Также для других белков семейства кератинов было показано участие в процессах иммунной защиты клеток. Например, цитокератин 6A участвует в антибактериальной защите (Chan et al., *J Cell Biol*, 2018, 217, 731–744), а ке-

ратин 8 уменьшает воспалительный процесс, подавляя активность пути TLR/NF-κB (Dong et al., Sci Rep, 2016, 6, 32710).

Таким образом, кератины участвуют в регуляции кожного воспалительного процесса и иммунного ответа на секрецию цитокинов. При этом нарушение этой регуляции приводит к дерматозам, псориазу, злокачественным заболеваниям кожи и другим последствиям.

Взаимодействие кератина 10 и TRIM14 было предварительно подтверждено иммуноокрашиванием и вестерн-блот гибридизацией на разных стадиях GS-TAP.

Таким образом, по нашим данным, TRIM14 взаимодействует с кератином 10. Мы предполагаем, что это один из возможных механизмов участия TRIM14 в иммунном и воспалительном ответе клеток.

**ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ
НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ
СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В СОХРАНЕНИИ КАЧЕСТВА
ЗДОРОВЬЯ И ПРОФИЛАКТИКЕ
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ ***

MAINTAINING HEALTH-RELATED QUALITY OF LIFE
AND PREVENTING CARDIOVASCULAR DISEASES BY MEANS
OF EARLY DIAGNOSIS OF CONNECTIVE TISSUE DYSPLASIA

З. А. Колхидова, Г. С. Кокаев, Р. А. Хестанова

*ФГБОУ ВО «Северо-Осетинская Государственная
Медицинская Академия» Минздрава РФ*

Z.A. Kolkhidova, G.S. Kokaev, R.A. Khestanova

North Ossetian State Medical Academy

E-mail:Levak9010@gmail.com, faaroo@mail.ru

Аннотация

В работе приведены результаты изучения распространённости и степени выраженности признаков недифференцированной патологии соединительной ткани (нДСТ) у 200 студентов-медиков. У респондентов с высокими баллами проведен анализ вегетативного статуса и микроциркуляции с использованием современных подходов, разрабатываются алгоритмы диагностики и профилактики осложнений с помощью фитоадаптогенов.

Abstract

The study presents the results of prevalence and severity of indications for undifferentiated pathology of connective tissue in 200 medical students.

Analysis of vegetative status and microcirculation was conducted on respondents with highest scores. Algorithms for diagnosing and preventing complications were developed with modern approaches including the one using phyto-adaptogens.

Цель и задачи исследования

Изучение особенностей проявлений нДСТ у студентов-добровольцев СОГМА, детей и подростков, обучающихся в муниципальных государственных учреждениях г.Владикавказа, профилактика ранних механизмов

© З. А. Колхидова, Г. С. Кокаев, Р. А. Хестанова, 2018.

* Научный руководитель — д-р мед. наук Ф. С. Датиева.

возникновения проявлений патологии соединительной ткани, определение критериев и разработка методов прогнозирования осложнений, разработка рекомендаций для индивидуальной профилактики.

Изучить характер проявлений нДСТ, нарушений микроциркуляции в структуре здоровья студентов-медиков Северо-Осетинской государственной медицинской академии.

Изучить профилактическое и лечебное влияние комплексных фитоадаптогенов, витаминотерапии, режимов ЛФК и питания на состояние здоровья и степень проявления нДСТ.

Основная часть

В исследовании участвовали 200 здоровых студентов-добровольцев СОГМА в возрасте от 17 до 22 лет. Распространенность признаков нДСТ оценивали с использованием анкеты, разработанной на основе оценочной таблицы Т. И. Кадуриной и Л. Н. Абакумовой (2010), В. В. Чемоданова (2015), Национальных рекомендаций (2016), состоящей из 50 вопросов. В анкету было включено информированное согласие на обработку и анализ представленных данных. Обработка анкетных данных проводилась в оценочной таблице MS Excel. В результате, по сумме баллов сформированы три степени выраженности клинических признаков нДСТ: 0–12 баллов — лёгкая степень (вариант нормы); 13–23 балла — средняя степень; более 23 — высокая степень. На втором этапе путем объективного осмотра с помощью оценочной таблицы, разработанной В. Г. Арсентьевым, сформировали 2 группы по 30 человек: с легкой степенью (вариант нормы) и выраженной степенью.

На третьем этапе обеим группам исследовали микроциркуляцию, оценили вегетативный статус и уровень тревоги и депрессии.

Обработка анкетных данных проводилась в SPSS 20.0, а затем данные переносили в оценочную таблицу MS Excel. Определение степени выраженности ДСТ проводилась по сумме баллов по фенотипическим признакам: при первой степени тяжести (вариант нормы) сумма баллов не превышает 12, умеренной — 23, а при выраженной она составляет 24 и более баллов. Анализ показателей микроциркуляции и вегетативного статуса проводили в MS Excel.

Результаты

У респондентов диагностирован высокий уровень выявляемых признаков нДСТ: у 12,5 % признаки лёгкой степени тяжести (вариант нормы), у 24,5 % — умеренной, у 63 % — выраженной степени. Гендерный анализ показал, что средняя степень выраженности у девушек встречается в 3 раза

чаще и относительно здоровых респондентов среди них в 1,5 раза меньше. У 54 % обследуемых отягощенный семейный анамнез, что при ассоциации с ДСТ является предиктором для развития острых гемодинамических осложнений.[2] У близких родственников 27 % анкетированных диагностированы болезни крови и/или онкологические заболевания. В нашем исследовании доклинические признаки синдрома дисплазии соединительной ткани сердца (частые кардиалгии, чувство «нехватки» воздуха) отмечалось у 1/3 респондентов.

Сравнительный анализ показателей микроциркуляции показал достоверное снижение перфузии у респондентов с выраженной степенью проявления нДСТ.

Оценка вегетативного статуса исследуемых проводилась по таблице Вейна. Из группы с нДСТ у 85 % исследуемых была диагностирована дисфункция вегетативной нервной системы.

Уровень тревожности и депрессии оценивались по «Госпитальной шкале тревоги и депрессии» с соответствующей оценкой в баллах. В результате более чем у половины лиц с нДСТ выявились субклинически и клинически выраженные тревога и депрессия.

Формирующийся при нДСТ спектр доклинических нарушений здоровья при отсутствии коррекции всегда сопровождается формированием целого ряда осложнений, в том числе и со стороны сердечно-сосудистой системы (схема 1).

нДСТ индуцирована точечными полигенными мутациями, которые нарушают нормальный метаболизм и формообразование-структуру соеди-



Схема 1. Патогенез развития осложнений при нДСТ

хеобронхиальная дискинезия, деформация, дискинезия желчевыводящих путей, висцероптоз и т. д.

Влияние внешних фактов на данные проявления усугубляет их течение и ведёт к развитию осложнений: аритмии, разрыв аневризмы, тромбофлебит, тромбозы, кровотечения, вторичная артериальная гипертония, бесплодие, вторичный остеоартроз, почечная, дыхательная, сердечная недостаточность, внезапная смерть.

В условиях экологического неблагополучия распространенность фенотипических признаков нДСТ встречается чаще, что обусловлено напряжением адаптационно-приспособительных механизмов организма под влиянием внешних факторов, что требует дальнейший скрининг населения на предмет ранней диагностики и распространение методов профилактики (схема 2). Профилактические методы должны включать средства, повышающие адаптационные резервы организма (фитоадаптогены), рациональную диетотерапию, метаболическую терапию, адаптированную физическую нагрузку.

**ИЗУЧЕНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА
И ОРГАНИЧЕСКОГО МАТРИКСА ЭМАЛИ ЗУБОВ
ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ
АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ**

**STUDY OF THE MINERAL COMPONENT AND ORGANIC MATRIX
OF THE ENAMEL OF TEETH OF HUMAN BY THE METHOD
OF ATOMIC-POWER MICROSCOPY**

А. С. Коршунов, В. П. Конев

*ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»
Минздрава России*

A. S. Korshunov, V. P. Konev

Omsk State Medical University, Russia

E-mail: Andrey_K_180588@mail.ru

Аннотация

В работе впервые представлены результаты исследования неорганического компонента и структуры органического матрикса эмали ретинированных 38-х зубов в возрастных группах 15–20, 21–30, 31–40 лет методом атомно-силовой микроскопии. В указанных группах наблюдаются различные темпы роста и созревания неорганического компонента, изменение которого связано с уменьшением пика органического матрикса. Наибольшая упорядоченность неорганического компонента наблюдается в группе 31–40 лет, где кристаллы имеют аркообразную форму, большие размеры, плотную упаковку, при уменьшении количества органического матрикса и размеров призматической оболочки. Изменение указанных параметров доказывает выраженную изменчивость и вариабельность эмали зубов, которая происходит в течение длительного периода жизни и развития человека.

Abstract

The results of the study of the inorganic component and the structure of the organic matrix of the enamel of retinified 38 teeth in the age groups 15–20, 21–30, 31–40 years by the method of atomic force microscopy are presented for the first time. In these groups, different rates of growth and maturation of the inorganic component are observed, the change of which is associated with a decrease in the peak of the organic matrix. The highest order of the inorganic component is observed in the group of 31–40 years, where the crystals have an arcuate shape, large dimensions, dense packing, with a decrease in the amount of

organic matrix and the dimensions of the prismatic shell. The change in these parameters proves the pronounced variability and variability of tooth enamel, which occurs during a long period of life and development of a person.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, эмаль, органический матрикс, минеральный компонент, вариабельность.

Цель исследования — изучить строение минерального компонента и органического матрикса эмали ретинированных 38-х зубов в возрастных группах 15–20, 21–30, 31–40 лет методом атомно-силовой микроскопии.

Введение

Многие авторы утверждают, что созревание эмали происходит в течение всей жизни человека, и его рассматривают как защитный физиологический процесс (G. Daculsi, B. Kerebel, 1978). Однако на сегодняшний день этот вопрос вызывает много дискуссий. Ряд отечественных и зарубежных ученых считают, что минерализация и созревание эмали заканчивается к 1–3 годам после прорезывания зуба (A. Nanci, 2003). Некоторые авторы утверждают о полном созревании эмали зубов еще до прорезывания зуба (F. J. Cuisinier, 1991; T. G. Diekwisch, 1995). Наиболее убедительной считается точка зрения, которая говорит об индивидуальных сроках созревания эмали, которое зависит от состава органических и минеральных субстанций и после прорезывания зуба определяющееся составом смешанной слюны (G. Daculsi, B. Kerebel, 1978; A. С. Коршунов, В. П. Конев, 2017). Таким образом, к сегодняшнему дню установлено, что в процессе созревания эмали повышается содержание минеральных веществ и изменяется структура минеральных призм, которые становятся более компактными (A. G. Fincham, J. Moradian-Oldak, 1999; A. С. Коршунов, В. П. Конев, 2017, 2018). При этом формируется тенденция об изменении эмали в течение дальнейшей жизни человека.

Несмотря на большое количество публикаций о развитии и созревании эмалевых кристаллов в постнатальном онтогенезе, отсутствуют убедительные данные о темпах роста эмалевых кристаллах, и влияние органического компонента на рост эмалевых кристаллов в разных возрастных периодах человека с использованием современных методов морфологического исследования, в частности атомно-силовая микроскопия.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 140 человек мужского пола, которые были разделены на возрастные группы 15–20, 21–30, 31–40 лет. У каждого обследованного удаляли по одному ретинированному 38 зубу по ортодонти-

ческим показаниям, с полностью сформированными корнями и не имеющего контакта с ротовой жидкостью. Полученные образцы эмали зубов подготавливали с использованием полировально — шлифовального станка Нейрис, шлифовальных кругов hermes с разной степенью зернистости, и полировальных кругов с алмазной суспензией Akasel, разного количества микрон. Исследование образцов осуществлялось на оптическом микроскопе марки Olympus jx 41, с увеличением 1000крат, с дальнейшим АСМ-микроскопированием в АСМ-микроскопе SolverPro (NT-MRT, Россия). Анализ образцов АСМ-изображения осуществлялся с помощью программного модуля обработки изображения Image Analysis NT-VDT (патент РФ № 2458675). В результате были получены цифровые снимки зубов у обследованных лиц, по которым анализировали степень упаковки, форму, размер эмалевых призм, размер оболочки эмалевых призм. Математическая обработка данных проводилась с помощью статистического пакета STATISTICA 10.0 (StatSoftInc. USA).

Результаты

Анализируя данные атомно-силовой микроскопии, важно отметить, что форма эмалевых призм во всех возрастных группах правильно упорядочена в виде шестигранной или семигранной фигуры. Наиболее постоянные ориентиры эмалевые призмы имеют в 31–40 лет, где доминируют эмалевые призмы в виде семигранной фигуры с очень плотной упаковкой ($6,02 \pm 0,25$ ед.). В возрастных группах 15–20 ($5,68 \pm 0,13$ ед.), 21–30 лет ($5,79 \pm 0,11$ ед.) они также представлены семигранной, однако в большом количестве встречаются шестигранные с более хаотичным и менее плотным расположением друг к другу эмалевые призмы. Плотность призм является важным показателем, которая определяется упаковкой коллагена, и указывает на зрелость эмалевой ткани, увеличиваясь с возрастом.

Наблюдается изменение не только формы и ориентации, но и размеров эмалевых призм при увеличении возрастного периода ($P < 0,05$). Необходимо обратить внимание на малые размеры в группе 15–20 лет ($4,68 \pm 0,51$ микрон), их увеличение в 21–30 лет ($5,59 \pm 0,47$ ед.), а наибольшие размеры наблюдаются в 31–40 лет ($6,13 \pm 0,38$ ед.). Важным аспектом ультраструктурного строения эмали являются неровности и выступы на поверхности эмалевых призм, наличие которых ярко выражено в возрастных группах 15–20 (рис. 1) и 21–30 лет, в 31–40 лет (рис. 2) шероховатости и неровности не наблюдались. Следует отметить, что в 31–40 лет эмалевые призмы отличаются меньшей рельефностью. Во всех сравниваемых возрастных группах мы не обнаружили разветвлений на множественные кристаллы и их слияние (рис. 1, 2).

Различная плотность упаковки кристаллов указывает на недостаточную зрелость эмали зубов в возрастных группах 15–20 и 21–30 лет, в сравнении с аналогичными количественными и качественными показателями в группе 31–40 лет, однако наблюдается увеличение темпа созревания эмалевых призм в указанных группах.

Наличие призматической оболочки мы наблюдали во всех сравниваемых группах, наибольшие ее размеры встречаются в группах 15–20 ($0,36 \pm 0,05$ микрон) и 21–30 лет ($0,25 \pm 0,04$ микрон), в группе 31–40 лет она практически не визуализируется и прерывается на некоторых участках ($0,07 \pm 0,01$ микрон) ($P < 0,05$).

Наибольший пик количества минерального компонента приходится на группу 31–40 лет, минимальный пик количества минерального компонента приходится на группу 15–20 лет ($P < 0,05$). Наименьший пик органического матрикса приходится на группу 31–40 лет ($P < 0,05$). Данное строение в группе 31–40 лет обеспечивает большую жесткость эмали и трудную растворимость, риск поражения патологическим процессом которой увеличивается после прорезывания зуба в полость рта.

Выводы. По результатам исследования размера, формы, упаковки эмалевых призм методом атомно-силовой микроскопии в различные возрастные периоды можно утверждать о высоких темпах их роста и развития. В группах 15–20, 21–30 лет эмалевые призмы напоминают аркообразную форму,

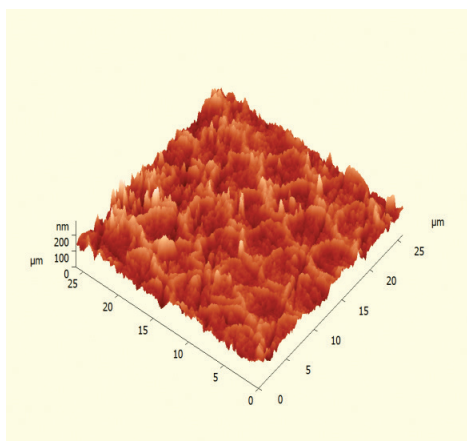


Рис. 1. Рельефность эмалевых призм по данным АСМ в группе 15–20 лет (3Д-изображение) Ув. $\times 50\,000$

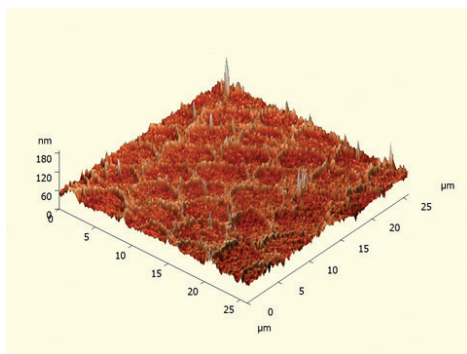


Рис. 2. Рельефность эмалевых призм по данным АСМ в группе 31–40 лет (3Д-изображение) Ув. $\times 50\,000$

менее плотно упакованы, имеют различные размеры, что характерно для незрелых призм. Однако, несмотря на выраженную вариабельность неорганического компонента в группах 15–20 и 21–30 лет отмечается активный рост и уплотнение эмалевых призм с возрастом. Метод атомно-силовой микроскопии позволяет детально изучить внутренние структуры эмали зубов, при этом определяя их конкретное содержание и индивидуальные принципы формообразования, путем количественной оценки минерального компонента и органического матрикса.

**РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ
ОПУХОЛЕВОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ
С РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ**

**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ANALYSIS
OF EXTRACELLULAR TUMOR DNA
IN COLORECTAL CANCER PATIENTS BLOOD PLASMA**

А. Е. Кулешова^{1,2}, У. А. Боярских²

¹Новосибирский государственный университет, Россия

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

A. E. Kuleshova^{1,2}, U. A. Boyarskikh²

¹Novosibirsk State University, Russia

²SB RAS ICBFM, Russia

E-mail: aekuleshova25@gmail.com

Аннотация

Анализ внеклеточной опухолевой ДНК в плазме крови является перспективным методом диагностики рака толстой кишки, в виду своей неинвазивности и возможности регулярного взятия образцов. Однако в плазме присутствует ДНК из других источников, и доля опухолевой ДНК крайне мала, поэтому необходимо работать с большими объемами образца и отличать опухолевую ДНК от ДНК из других источников. Существующие на данный момент методы анализа не имеют общей согласованности, и в полной мере не выполняют поставленных задач. В рамках данной работы разрабатывается оптимальный метод анализа внеклеточной опухолевой ДНК из плазмы крови пациентов с РТК.

Abstract

Analysis of extracellular tumor DNA in blood plasma is promising as a diagnostic tool for colorectal cancer, in view of its non-invasiveness and the possibility of regular sampling. However, DNA is present in the plasma from other sources, and the proportion of tumor DNA is extremely small, so it is necessary to work with large volumes of the sample and distinguish between tumor DNA and DNA from other sources. Existing methods of analysis do not have general consistency, and do not fully fulfill the tasks set. Within this work, an optimal method for the analysis of extracellular tumor DNA from the plasma of patients with CRC is being developed.

Рак толстой кишки (РТК) является третьим по распространенности онкологическим заболеванием, ежегодно регистрируется более 1 млн. новых случаев.

Успех в лечении данного заболевания зависит, в частности, от своевременного и правильного подбора терапии. Поэтому, среди всех приложений диагностики РТК, большое значение имеет определение молекулярного типа опухоли, который, в свою очередь, становится решающим фактором при подборе т.н. «таргетной» терапии.

Для молекулярной диагностики РТК используются разные типы биологического материала. Среди них, внеклеточная опухолевая ДНК из плазмы крови пациентов является одним из перспективных материалов, поскольку взятие образцов плазмы не требует хирургического вмешательства и может производиться многократно.

Однако в плазме крови присутствует внеклеточная ДНК из других источников, и доля опухолевой составляет всего от 0,05 до 5 %, в связи с чем необходимо отличать опухолевую ДНК от ДНК из других источников. Поэтому разработка высокоспецифичного и чувствительного метода детекции опухолевой ДНК в плазме крови пациентов с РТК стала основной целью данного исследования.

В рамках данной работы были поставлены следующие задачи:

- Сформировать выборку пар образцов плазма-опухоль, полученных от пациентов с РТК;
- Разработать метод выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови, сравнить его с референсным методом;
- На основе общедоступных баз данных выбрать локусы, с наиболее часто встречающимися мутациями при РТК;
- Разработать метод приготовления библиотек для дальнейшего секвенирования;
- Секвенировать библиотеки на платформе MiSeq (Illumina);
- Определить соматические мутации в образцах плазмы крови пациентов с РТК;
- Определить чувствительность, специфичность и конкордантность разработанного метода.

Для дальнейшего анализа, нами была сформирована выборка, состоящая из 43 пар образцов плазма-опухоль, среди которых 12 образцов было получено от мужчин, 31 — от женщин, средний возраст которых составил 67,4 года. Также было получено 66 образцов плазмы без парного образца опухоли, которые тоже были задействованы в исследовании.

Для выделения внеклеточной ДНК из плазмы крови, нами был разработан метод, в котором ДНК в плазме концентрировалась 20 % раствором

полиэтиленгликоля, инкубировалась в модифицированном лизирующем буфере и осаждалась при помощи изопропанола.

Для оценки эффективности разработанного нами метода, было проведено его сравнение со стандартным протоколом Qiagen (QIAmp Mini Kit). После выделения внеклеточной ДНК с помощью разработанного и референсного методов, была оценена концентрация ДНК в образцах. Среднее значение концентрации ДНК в образцах, выделенных разработанным методом, составила 0,2767 нг/мкл (ст. отклон. — 0,1562), референсным методом — 0,2769 (ст. отклон. — 0,1685). Таким образом, разработанный нами метод не продемонстрировал существенных различий со стандартным протоколом Qiagen.

Далее, для оценки уровня внеклеточной опухолевой ДНК в плазме, а также определения молекулярного субтипа опухоли, нами были отобраны локусы с наиболее часто встречающимися мутациями при РТК. Для этого нами использовались базы данных COSMIC, в которой выбирались опухоли толстой кишки всех гистологических типов и локализаций, а также отбирались данные только полногеномного секвенирования.

В результате данного отбора, нами были выбраны 349 соматических мутаций, наиболее часто встречающихся при РТК. Наиболее частые из них встречались в генах TP53, KRAS, PIK3CA, FBXW7, APC, BRAF.

Таким образом, на данном этапе нами был разработан метод выделения ДНК из плазмы крови, а также отобраны локусы с наиболее частыми мутациями при РТК. В дальнейшем планируется выполнение последующих задач, заявленных ранее.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК/ДНК-КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ *

INVESTIGATION OF THE ENERGY PROFILE OF DNA DUPLEX DENATURATION BY MEANS OF ATOMIC FORCE SPECTROSCOPY

Н. Н. Курусь¹, Ф. Н. Дульцев^{1,2}, А. А. Ломзов^{2,3},
Г. Ю. Шевелёв^{2,3}, Е. С. Дюдеева³, Д. В. Пышный³

¹ *ФГБУН Институт физики полупроводников
им. А. В. Ржанова СО РАН*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *ФГБУН Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

N. N. Kurus¹, F. N. Dultsev^{1,2}, A. A. Lomzov^{2,3},
G. Yu. Shevelev^{2,3}, E. S. Dyudeeva³, D. V. Pyshnyi³

¹ *Institute of semiconductor physics SB RAS*

² *Novosibirsk State University*

³ *Institute of chemical biology and fundamental medicine SB RAS*

Аннотация

Исследование энергетического профиля разрыва коротких ДНК/ДНК-комплексов открывает возможности для более детального изучения механизмов образования и денатурации двойной спирали ДНК. Метод атомно-силовой спектроскопии (АСС) является эффективным инструментом, позволяющим определить количество и положения потенциальных барьеров вдоль координаты реакции, а также кинетические параметры денатурации двойной спирали. В данной работе методом АСС исследовали энергетические профили механической денатурации модельных ДНК-дуплексов длиной 20 пар оснований с А/Т- и Г/С-богатыми концами. Экспериментально установлено наличие двух потенциальных барьеров на пути денатурации. Показано, как внедрение однонуклеотидного несоответствия в Г/С- богатом конце влияет на прочность ДНК/ДНК-комплекса и параметры энергетического профиля его диссоциации.

Abstract

Investigation of the energy profile of the short DNA duplexes rupture opens the possibility for a more detailed study of the mechanisms of formation and denaturation of a DNA

© Н. Н. Курусь, Ф. Н. Дульцев, А. А. Ломзов, Г. Ю. Шевелёв, Е. С. Дюдеева, Д. В. Пышный, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00320.

double helix. The atomic force spectroscopy (AFS) method is an effective tool for determining the number and positions of potential barriers along the reaction coordinate, as well as the kinetic parameters of denaturation. In this study, the energy profiles of mechanical denaturation of model 20 base pairs length DNA/DNA complexes with A/T- and G/C-rich ends were studied by the AFS method. The presence of two potential barriers on the path of denaturation was experimentally established. It is shown how the introduction of a single nucleotide mismatch in the GC-rich end affects the strength of the DNA/DNA complex and the parameters of the energy profile of its dissociation.

ДНК является ключевой биомолекулой, выполняющей роль хранения и передачи генетической информации. Ряд процессов, происходящих в организме с её участием, сопровождаются образованием и распадом двойной спирали. Формирование наиболее общих представлений о внутренних механизмах протекания этих реакций до сих пор остается актуальной фундаментальной задачей. Один из основных подходов к её решению заключается в исследовании энергетического профиля денатурации двойной спирали ДНК.

Диссоциация биомолекулярного комплекса, в том числе и двойной спирали ДНК, может быть представлена как химическая реакция, протекающая с преодолением одного или нескольких потенциальных барьеров. Воздействие на комплекс внешней силы вдоль координаты реакции приводит к снижению потенциальных барьеров, уменьшению времени его жизни и увеличению вероятности перехода в несвязанное состояние. При некоторой величине силы, приложенной к молекулам комплекса, преодоление барьеров приводит к его разрыву. Изучение зависимости силы разрыва биомолекулярного комплекса от скорости его нагружения составляет основу метода динамической силовой спектроскопии и позволяет установить количество и расположение потенциальных барьеров, а также равновесные значения константы скорости диссоциации и времени жизни комплекса [1].

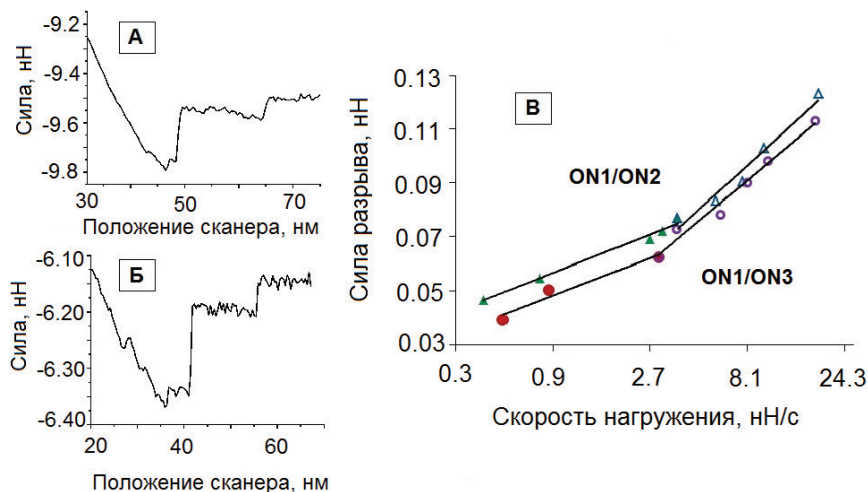
Метод атомно-силовой спектроскопии (АСС) обладает высокой чувствительностью и широким динамическим диапазоном (скорости нагружения $\sim 0,1 \div 100$ нН/с). В данной работе методом АСС исследовали параметры энергетических профилей денатурации двойных спиралей ДНК длиной 20 пар оснований. ДНК/ДНК-комплексы ON1/ON2 и ON1/ON3, формируемые модельными олигонуклеотидами (Таблица 1), содержат A/T- и G/C-богатые концы длиной 5 пар оснований и среднюю часть смешанного состава длиной 10 пар оснований. При этом комплекс ON1/ON3 содержит однонуклеотидное несоответствие в G/C-богатом конце.

Таблица 1

Последовательности модельных олигонуклеотидов ДНК

Олигонуклеотид	Последовательность 5'-3'
ON1	AAT TAC TCG AAG CTA CGG CC-NH ₂
ON2	GGC CGT AGC TTC GAG TAA TT- NH ₂
ON3	GG A CGT AGC TTC GAG TAA TT-NH ₂

Олигонуклеотид ON1 ковалентно иммобилизовали на покрытой золотом подложке, а один из олигонуклеотидов ON2 или ON3 — на острие зонда для АСС. При сближении зонда с подложкой происходило формирование двухцепочечного комплекса, а при последующем отводе зонда — его разрыв в сдвиговом режиме, при котором внешняя сила направлена вдоль оси спирали. Силу разрыва комплекса определяли по высоте характерных пиков, наблюдаемых на силовых кривых (см. рисунок, А, Б). Измерения проводили в диапазоне скоростей нагружения от 0,4 до 20 нН/с., варьируя скорость отвода зонда от 100 до 3000 нм/с.



Типичные силовые кривые, наблюдаемые при разрыве комплексов ON1/ON2 (А) и ON1/ON3 (Б); Зависимость силы разрыва комплексов от скорости нагружения, построенная в полулогарифмическом масштабе (В): растяжение двойной спирали комплекса ON1/ON2 ($0,47 \div 3,7$ нН/с), разрыв комплекса ON1/ON2 ($3,7 \div 18,3$ нН/с), растяжение двойной спирали комплекса ON1/ON3 ($0,51 \div 3$ нН/с), разрыв комплекса ON1/ON3 ($3 \div 17,6$ нН/с)

На полученных зависимостях сил разрыва от скорости нагружения в обоих случаях наблюдаются два прямолинейных участка с разными углами наклона, что указывает на присутствие двух потенциальных барьеров на пути денатурации модельных ДНК-дуплексов ON1-ON2 и ON1-ON3 (см. рисунок, *B*). Положения барьеров вдоль координаты реакции (Δx), рассчитанные на основе данных зависимостей, позволяют предположить, что первый из них связан с растяжением двойной спирали, а второй — с разрывом водородных связей между цепями. При этом внедрение в последовательность однонуклеотидного несоответствия на положениях барьеров не отразилось.

Как и ожидалось, прочность комплекса ON1/ON3, содержащего однонуклеотидное несоответствие, меньше прочности комплекса ON1/ON2 во всем диапазоне скоростей нагружения. Расчеты (*табл. 2*), выполненные на основе экспериментальных данных, показывают, что наличие однонуклеотидного несоответствия приводит к практически двукратному увеличению константы скорости диссоциации (K_{diss}), связанной с разрывом водородных связей (т. е. с преодолением второго барьера), и не влияет на константу скорости диссоциации, связанную с растяжением двойной спирали (преодоление первого барьера).

Таблица 2

Кинетические параметры механической денатурации дуплексов ДНК

Комплекс		Δx , нм	K_{diss} , 1/с	τ_{diss} , с
ON1/ON2	Область 1 (0,47÷3,7 нН/с)	0.14	10.8	0.09
	Область 2 (3,7÷18,3 нН/с)	0.32	0.89	1.12
ON1/ON3	Область 1 (0,51÷3 нН/с)	0.15	10.8	0.09
	Область 2 (3÷17,6 нН/с)	0.32	1.6	0.63

Как правило, в подобных экспериментах наблюдают линейную зависимость силы разрыва дуплексов ДНК в широком диапазоне скоростей нагружения [2, 3]. При этом полученные в данной работе значения кинетических констант согласуются с литературными данными.

Литература

1. E. Evans. Biophysical chemistry, 1999, 82, 83–97.
2. T. Strunz et al Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96, 11277–11282.
3. L. H. Pope et al. European Biophysics Journal, 2001, 30, 153–62.

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ
ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ
ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКОГО ТРИТЕРПЕНОИДА СМ,
НЕСУЩЕГО ЦИАНО-ЕНОНОВЫЙ ФАРМАКОФОР:
IN SILICO АНАЛИЗ ***

MOLECULAR DETERMINANTS OF THE ANTITUMOR EFFECTS
OF SEMISYNTHETIC TRITERPENOID SM, BEARING
CYANO-ENONE PHARMACOPHORE:
AN IN SILICO APPROACH

А. В. Марков¹, А. Э. Кель^{1,2}, О. В. Саломатина³,
Н. Ф. Салахутдинов³, М. А. Зенкова¹, Е. Б. Логашенко¹

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

² *geneXplain GmbH, Вольфенбюттель, Германия*

³ *Новосибирский институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия*

A. V. Markov¹, A. E. Kel^{1,2}, O. V. Salomatina³, N. F. Salakhutdinov³,
M. A. Zenkova¹, E. B. Logashenko¹

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

² *geneXplain GmbH, Wolfenbüttel, Germany*

³ *N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry
SB RAS, Novosibirsk, Russia*

E-mail: andmrkv@gmail.com

Аннотация

Проведен анализ влияния полусинтетического тритерпеноида солоколон метила (СМ) на транскриптом клеток рака шейки матки человека КВ-3-1. Установлено, что СМ вызывает гибель опухолевых клеток путем запуска стресса эндоплазматического ретикулума с последующей индукцией апоптоза. Выявлены потенциальные первичные мишени СМ (SERCA и Grp94) и мастер-регуляторы процессов, запускаемых данным тритерпеноидом (ATF4, DDIT3, CEBP и XBP1).

© А. В. Марков, А. Э. Кель, О. В. Саломатина, Н. Ф. Салахутдинов, М. А. Зенкова, Е. Б. Логашенко, 2018.

* Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 17-75-20120).

Abstract

The effect of semisynthetic triterpenoid soloxolone methyl (SM) on transcriptome of human cervical carcinoma cells KB-3-1 was analyzed. It was found that SM induced endoplasmic reticulum stress with subsequent activation of apoptosis. Probable primary targets of SM (SERCA and Grp94) and master regulators of the processes triggered into tumor cells by triterpenoid (ATF4, DDIT3, CEBP и XBP1) were identified.

Пентациклические тритерпеноиды благодаря наличию широкого спектра биологической активности, высокому химическому разнообразию, относительно низкой токсичности и способности воздействовать на множественные мишени в организме являются перспективным источником новых фармакологических агентов. В настоящий момент ведется большой объем работ по увеличению уровня биоактивности и селективности действия данных соединений путем химической трансформации их структуры [1]. Наибольшей успех в данной области связан с открытием циано-еноновой фармакофорной группировки, введение которой в структуру тритерпеноидов приводит к значительному усилению их противоопухолевого и противовоспалительного потенциала [1].

Ранее нами был синтезирован солоколон метил (далее СМ, метил 2-циано-3,12-диоксо-18 β H-олеан-1(2),11(9)-диен-30-оат) — производное глицирретовой кислоты, содержащее в кольце А циано-еноновую группировку. Было показано, что СМ подавляет пролиферацию опухолевых клеток различного происхождения *in vitro* (IC_{50} = 0,3–5,0 мкМ), приводит к остановке клеточного цикла на фазе G2/M, активирует митохондриальный каспазо-зависимый путь апоптоза [2], эффективно ингибирует рост мышины карциномы Кребс-2 *in vivo* [3].

Целью данного исследования являлось определение детального механизма действия СМ и его возможные первичные мишени в опухолевых клетках человека. Для этого клетки рака шейки матки человека KB-3-1 инкубировали в присутствии СМ (1 мкМ) в течение 1, 2, 3, 4, 6 и 10 ч и проводили полнотранскриптомный анализ экспрессии генов на кДНК-микрочипах HumanHT-12 v4 BeadChip (Illumina, США). Затем с помощью платформы geneXplain (geneXplain GmbH, Германия) полученные сырые данные (raw data) были нормализованы, с помощью гипергеометрического анализа были рассчитаны относительные изменения уровней экспрессии генов в опыте по сравнению с контролем (клетки, инкубированные в отсутствие СМ). Всего было выявлено 1245 дифференциально экспрессирующихся генов (далее ДЭГ, кратность изменения уровня экспрессии $\geq 1,5$, $p < 0,001$). Функциональный анализ ДЭГ, выявленных на ранних этапах воздействия СМ (1–4 ч) (базы данных Gene Ontology, KEGG, REACTOME, WikiPathways), свиде-

тельствует о способности тритерпеноида вызывать в опухолевых клетках дисрегуляцию гомеостаза эндоплазматического ретикулама (ЭПР), приводящую к запуску стресса ЭПР (4 ч). Эффект СМ сопровождается также активацией ряда компенсаторных механизмов, являющихся, однако, недостаточными для полной цитопротекции — к 6–10 ч воздействия СМ наблюдается высокий уровень обогащения ДЭГ по терминам, ассоциированным с клеточной гибелью. В силу того, что стресс ЭПР является известным индуктором цитопротекторных сигнальных путей и апоптоза [4], именно ЭПР рассматривается нами в качестве потенциальной первичной мишени СМ в опухолевых клетках.

Анализ промоторных участков ДЭГ с последующей идентификацией транскрипционных факторов, способных связываться с ними (базы данных: Transfac, Jaspar, Encode, Swissregulon, Homer), подтвердил ЭПР-направленное действие СМ. В результате анализа было установлено, что ATF4, DDIT3, CEBP и XBP1 могут рассматриваться в качестве мастер-регуляторов процессов, запускаемых СМ. Согласно базе данных Genecards, данные транскрипционные факторы являются мастер-регуляторами стресса ЭПР.

С целью поиска потенциальных первичных белковых мишеней СМ была проанализирована модуляция транскриптома опухолевых клеток, вызванная СМ и библиотекой низкомолекулярных соединений с известным механизмом действия, с использованием базы данных Connectivity Map. Установлено, что эффект СМ на транскриптом опухолевых клеток с высокой долей вероятности сходен с действием известных индукторов стресса ЭПР тапсигаргина ($p = 3,978E-95$) и гелданамицина ($p = 1,747E-58$) — ингибиторов Ca^{2+} -АТФазы сарко/эндоплазматического ретикулама SERCA и белка теплового шока Grp94, соответственно. С помощью молекулярного докинга установлено, что SERCA и Grp94 могут рассматриваться в качестве белковых мишеней СМ — СМ может связываться с SERCA ($\Delta G = -9.2$ kcal/mol) и Grp94 ($\Delta G = -7.2$ kcal/mol), формируя водородные и гидрофобные связи, аналогичные связям в кристаллических комплексах данных белков с тапсигарином и гелданамицином, соответственно.

Литература

1. Markov A. V., Zenkova M. A., Logashenko E. B. Modulation of tumour-related signaling pathways by natural pentacyclic triterpenoids and their semisynthetic derivatives // *Current medicinal chemistry*. — 2017. — Т. 24. — №. 13. — С. 1277–1320.
2. Logashenko E. B., Salomatina O. V., Markov A. V., Korchagina D. V., Salakhutdinov N. F., Tolstikov G. A., Vlassov V. V., Zenkova M. A. Synthesis and pro-apoptotic activity of novel glycyrrhetic acid derivatives // *ChemBioChem*. — 2011. — Т. 12. — №. 5. — С. 784–794.

-
3. Markov A. V., Sen'kova A. V., Zenkova M. A., Logashenko E. B. Novel Glycyrrhetic Acid Derivative Soloxolone Methyl Inhibits the Inflammatory Response and Tumor Growth in vivo //Molecular Biology. — 2018. — T. 52. — №. 2. — C. 262–268.
 4. Sano R., Reed J. C. ER stress-induced cell death mechanisms //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. — 2013. — T. 1833. — №. 12. — C. 3460–3470.

РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9*

CRISPR/CAS9-MEDIATED REGULATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF SMALL NUCLEOLAR RNAs ACTIVITY

А. М. Матвеева^{1,2}, Ю. А. Филиппова¹, Е. С. Журавлев¹, Е. А. Балахонova¹,
М. М. Тимофеева¹, Д. В. Семенов¹, Г. А. Степанов^{1,2}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной медицины,
Сибирское отделение Российской Академии наук*

² *Новосибирский государственный университет*

A. M. Matveeva^{1,2}, J. A. Filippova¹, E. S. Zhuravlev¹, E. A. Balakhonova¹,
M. M. Timofeeva¹, D. V. Semenov¹, G. A. Stepanov^{1,2}

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences*

² *Novosibirsk State University*

Аннотация

В рамках данной работы описана стратегия для CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования генов C/D-бокс- малых ядрышковых РНК (мяоРНК), относящихся к одному из подклассов малых некодирующих РНК (нкРНК). Были получены плазмидные конструкции, экспрессирующие компоненты системы редактирования, направленные на внесение разрывов в участки гена GAS5 (Growth Arrest Specific 5), кодирующие мяоРНК-мишени. Для моноклонов на основе линии 293FT были определены виды мутаций, проведен как анализ экспрессии генов целевых мяоРНК, так и массовое параллельное секвенирование транскриптома. Для характеристики функциональных изменений с использованием разработанной ранее в нашей лаборатории методики была проведена оценка уровня целевого 2'-О-метилования рибосомной РНК.

Abstract

The current study presents a novel strategy for CRISPR/Cas9-mediated box C/D small nucleolar RNA (snoRNA) genes editing in human cells. Box C/D snoRNAs present one of the subclasses of small non-coding RNAs (ncRNAs). We obtained plasmid constructs expressing CRISPR/Cas9 components guiding double-strand breaks into GAS5 (Growth

© А. М. Матвеева, Ю. А. Филиппова, Е. С. Журавлев, Е. А. Балахонova, М. М. Тимофеева, Д. В. Семенов, Г. А. Степанов, 2018.

* Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ 18-29-07073.

Arrest Specific 5) gene regions encoding target snoRNAs. Types of mutations were characterized for 293FT-derived single cell clones; target gene expression analysis was carried out. Transcriptome was analysed using RNA-Seq method. The 2'-O-methylation level of target nucleotide in ribosomal RNA was evaluated by the method that had been developed earlier in our laboratory, and functional changes were characterized in the mutant cells.

Малые ядрышковые РНК принимают участие в пост-транскрипционной модификации рибосомной РНК (рРНК) в эукариотических клетках. C/D-бокс-мяоРНК являются одним из подклассов мяоРНК и отвечают за направленное 2'-О-метилование нуклеотидов рРНК. Функционирование обеспечивается наличием в структуре консервативных C- и D-боксов и направляющей последовательности, специфично комплементарной определенной области рРНК.

Различные техники геномного редактирования, широко используемые для направленного нокаута или мутагенеза генов, являются эффективным инструментом не только для изменения уровня экспрессии гена-мишени, но и для изменения конечной структуры и функции его продукта. Система CRISPR/Cas9 является наиболее распространенным, хорошо изученным и простым в использовании методом геномного редактирования.

Целью работы являлось получение клеточных линий, мутантных по генам мяоРНК.

Основным результатом работы является разработанная стратегия геномного редактирования малых ядрышковых РНК с помощью системы CRISPR/Cas9. Стратегия, в первую очередь, включала в себя рациональный выбор мяоРНК-мишеней с направлением вносимых разрывов в функциональные элементы на основании имеющихся в структурах мяоРНК мотивов РАМ. Полученные данные позволяют заключить, что наиболее оптимальной мишенью в структуре C/D-бокс-мяоРНК являются D- и D'-боксы, однако, выбор должен осуществляться для каждой мяоРНК индивидуально в соответствии с имеющимися РАМ.

В качестве объекта исследований было выбрано множество закодированных в интронах гена GAS5 C/D-бокс-мяоРНК, а именно: U74, U75, U77 и U80. Они осуществляют 2'-О-метилование C3820, C4032, A1521 и G1612 нуклеотидов 28S рРНК человека, соответственно. Интересно, что U80 мяоРНК имеет две мишени 2'-О-метилирования, одна из которых совпадает с мишенью U77 мяоРНК (A1521). Выбор был обусловлен наличием мотивов РАМ вблизи консервативных последовательностей (D-, D'-, C- и D-бокса, соответственно).

Были получены ДНК-конструкции на основе вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP, с помощью которых была проведена дальнейшая трансфекция клеток

линии 293FT. Были отобраны GFP-положительные клетки и получены моноклоны. Для анализа изменений экспрессии мяоРНК-мишеней методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени были подобраны праймеры и референсные гены. Было проведено массовое параллельное секвенирование транскриптома мутантных клеток и дифференциальный анализ экспрессии генов. Кроме того, была разработана методика оценки изменений в уровне 2'-О-метилирования.

Общая эффективность проведенного редактирования была оценена с помощью обработки секвенограмм в ПО «TIDE» и составила 34,4 % и 45,6 % для U75 и U77 мяоРНК, соответственно. Линии клеток, мутантные по U74, показали низкую скорость роста и жизнеспособность. На данный момент удалось получить моноклоны, мутантные по U75 или по U77 мяоРНК.

Секвенирование по Сэнгеру участка генома для моноклона, полученного действием конструкции, направленной на редактирование U75 мяоРНК, выявило две делеции в каждом из аллелей, 9 и 10 нт, при этом в область делеции попал D'-бокс и часть области узнавания рРНК-мишени 2'-О-метилирования. Для моноклона, полученного действием конструкции, направленной на редактирование U77 мяоРНК, была выявлена инсерция 1 нт и делеция 11 нт в целевом участке — консервативном С-боксе, при этом мутации не изменили структуру С-бокса.

Анализ изменений в экспрессии мяоРНК-мишеней методом ОТ-ПЦР выявил снижение уровня диких форм, вплоть до полного, что подтвердилось при дифференциальном анализе экспрессии генов. При этом были обнаружены зрелые формы мяоРНК с измененной структурой — форма с делецией 9 нт для моноклона, мутантного по гену U75 мяоРНК и обе мутантные формы для моноклона, мутантного по гену U77 мяоРНК. Интересно, что данные массового параллельного секвенирования также показали для обеих мутантных линий повышение экспрессии генов, ассоциированных с процессами внутреннего иммунного ответа.

Для оценки изменений глубины 2'-О-метилирования был разработан протокол терминации обратной транскрипции с последующей ПЦР в режиме реального времени. Было показано снижение глубины модификаций для моноклона с мутациями в гене U75 мяоРНК, что свидетельствует о подавлении ее активности. При этом не наблюдалось изменений в профиле 2'-О-метилирования для моноклона с мутациями в гене U77 мяоРНК.

Разработанная стратегия позволит проводить функциональный анализ мяоРНК, перенаправлять их активность и получать клеточные линии с новыми свойствами.

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ (CAR),
СПЕЦИФИЧНЫХ К БЕЛКАМ PSMA И PSCA ***

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF PSMA- AND PSCA-SPECIFIC
CHIMERIC ANTIGEN RECEPTORS (CAR)**

Д. А. Матвиенко

*Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН
Новосибирский государственный университет*

D.A. Matvienko

*Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS
Novosibirsk State University, Russia*

E-mail: dacikmatvienko@gmail.com

Аннотация

Одним из современных методов иммунотерапии различных типов онкологических заболеваний является терапия с использованием Т- или НК-клеток, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR). Однако, эффективность этого подхода для терапии солидных типов рака, таких как рак предстательной железы, пока невысока. Мы предполагаем, что оптимизация структуры CAR позволит повысить их эффективность в борьбе с солидными типами рака. Данная работа направлена на *in vitro* сравнение цитотоксической активности CAR, имеющих различное строение шарнирного участка рецептора. В ходе работы нами было получено шесть НК-клеточных линий, экспрессирующих CAR специфичные к двум основным маркерам рака предстательной железы — белкам PSMA и PSCA, с шарнирными районами, заимствованными от молекул IgG1 или CD8a, либо без шарнирного района. Было показано, что все полученные клеточные линии экспрессируют CAR на поверхности клеток. Анализ цитотоксической активности выявил, что для PSMA-специфичных CAR структура шарнирного района ощутимо влияет на уровень цитотоксической активности клеток-эффекторов *in vitro*, хотя для PSCA-специфичных CAR подобного эффекта замечено не было.

Abstract

T- and NK-cells armed with chimeric antigen receptors (CARs), are novel and promising instruments for cancer treatment, however, its efficiency in solid cancers, such as

prostate cancer (PC), still remains low. It is possible that optimizing the structure of the CAR will improve their efficiency in the context of solid cancers. Our work is aimed at comparing the *in vitro* performance of CARs of various designs of hinge regions, recognizing two PC surface markers: PSMA and PSCA. As a result we obtained six NK-cells lines CARs (with hinge region of IgG, CD8 and one is hingeless). Our obtained cells express CAR on the cell surface. It was found that for PSMA-specific CAR the structure of hinge region affects the level of cytotoxic activity *in vitro*, although for PSCA-specific CAR these effects have not been identified.

На сегодняшний день рак предстательной железы — это одно из наиболее распространенных онкологических заболеваний среди мужчин. Согласно данным общемировой статистики рак простаты является третьей по частоте причиной смерти от злокачественных опухолей мужчин старшего возраста. К сожалению, примерно 90 % случаев рака предстательной железы выявляются на поздних стадиях заболевания, что приводит к летальному исходу у более, чем половины больных и продолжает оставаться серьезной проблемой во всем мире. В связи с этим, развитие новых подходов для лечения раковых заболеваний является крайне востребованной задачей.

В последнее время активный интерес проявляется к одному из современных методов адаптивной клеточной иммунотерапии с использованием клеток иммунной системы, экспрессирующих химерные антигенные рецепторы (CAR). Данный тип иммунотерапии основан на *ex vivo* трансгенезе аутологических Т-лимфоцитов пациента, с последующим введением их обратно в организм больного. Пролиферируя в организме продолжительное время, CAR-клетки способны находить и направленно уничтожать опухолевые клетки, экспонирующие распознаваемый CAR антиген [1]. На сегодняшний день наиболее впечатляющие показатели данная терапия демонстрирует в отношении онкогематологических заболеваний В-клеточной природы. Вследствие такого взрывного успеха подхода в отношении гематологических заболеваний, растет интерес к использованию CAR-клеток для лечения солидных злокачественных новообразований, к которым относится карцинома предстательной железы. Однако распространение этой технологии применительно к солидным видам рака сталкивается с рядом трудностей. Последние исследования в этой области свидетельствуют о том, что функциональность CAR Т-клеток в значительной мере зависит от природы и структуры шарнирного района CAR [2,3], что делает интересным поиск наиболее оптимальной и эффективной структуры этого района CAR.

Данная работа направлена на исследование влияния шарнирного района рецептора на функционирование PSCA-, PSMA- специфичных CAR в контексте NK-клеточной линии YT. В ходе работы мы воспользовались

разработанной нами ранее платформой лентивирусных векторов для сравнения различных вариантов дизайна CAR в унифицированном формате. С помощью данной платформы были наработаны псевдовиральные частицы и получено шесть NK-клеточных линий, экспрессирующих PSMA и PSCA-специфичные CAR, с шарнирным районом, заимствованным от молекул IgG1 или CD8a, либо без шарнирного района. С помощью метода проточной цитометрии было показано, что все полученные клеточные линии экспрессируют CAR на поверхности клеток (уровень экспрессии превышал 97 %). Анализ цитотоксической активности проводили путем инкубации эффекторных клеток (CAR NK-клеток) с клетками-мишенями (клетки рака простаты человека) с последующим анализом FACS и RTCA. Было обнаружено, что для PSMA-специфичных CAR структура шарнирного района ощутимо влияет на уровень цитотоксической активности клеток-эффекторов *in vitro* — наибольший цитотоксический эффект оказывают CAR-клетки без шарнирного района. Для PSCA-специфичных CAR подобного эффекта замечено не было, что может указывать, на тот факт, что CAR со специфичностью к небольшим белкам (в данном случае PSCA) обладают меньшей требовательностью к шарнирному участку. В настоящее время нами проводятся работы по получению первичных Т-клеток, экспрессирующих CAR против PSMA.

Полученные данные помогут нам выявить наиболее выгодную структуру шарнирного района CAR и в перспективе могут быть полезны для создания клинически-эффективных вариантов CAR для лечения рака предстательной железы.

Литература

1. Gianpietro Dotti, Stephen Gottschalk, Barbara Savoldo. Design and Development of Therapies using Chimeric Antigen. Immunol Rev ; 257(1). 2014;580:6269–74.
2. Nishio N, Diaconu I, Liu H, Cerullo V, Caruana I, Hoyos V, et al. Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors. Cancer Res. 2014;74:5195–205.
3. Кулемзин С. В., Кузнецова В. В., Мамонкин М., Таранин А. В., Горчаков А. А. Основы дизайна химерных антигенных рецепторов. Acta Naturae. 2017;1:6–15.

**N-МЕЗИЛ ФОСФОРАМИДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ
ЭФФЕКТИВНО ИНАКТИВИРУЮТ ОНКОГЕННУЮ
МИКРОРНК-21 *IN VITRO* И *IN VIVO* И ЯВЛЯЮТСЯ
ДОСТОЙНОЙ АЛЬТЕРНАТИВОЙ
ФОСФОТИОАТНЫМ АНАЛОГАМ ***

**N-MESYL PHOSPHORAMIDATE OLIGONUCLEOTIDES
EFFECTIVELY INACTIVATE ONCOGENIC MIRNA-21
IN VITRO AND *IN VIVO* AND REPRESENT A WORTHY ALTERNATIVE
TO PHOSPHOTHIOLATE ANALOGS**

С. К. Мирошниченко, О. А. Патутина, Е. А. Буракова, А. В. Сенькова,
Б. П. Челобанов, Д. А. Стеценко, В. В. Власов, М. А. Зенкова

*Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

S. K. Miroshnichenko, O. A. Patutina, E. A. Burakova, A. V. Sen'kova,
B. P. Chelobanov, D. A. Stetsenko, V. V. Vlassov, M. A. Zenkova

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS

E-mail: sveta-mira@yandex.ru

Аннотация

В данной работе впервые были представлены и всесторонне исследованы анти-микроРНК-21 олигонуклеотиды, содержащие в своём составе новую N-мезил фосфорамидную модификацию межнуклеотидных связей, и было проведено сравнение их биологических свойств с характеристиками широко применяемой фосфотиоатной модификации. Было выявлено, что мезильные олигонуклеотиды более эффективно подавляют ключевые события канцерогенеза *in vitro* и опухолевый рост *in vivo* по сравнению с фосфотиоатными аналогами.

Abstract

For the first time anti-miRNA-21 oligonucleotides that possess novel N-mesyl phosphoramidate modification of internucleotidic bonds were presented and thoroughly investigated and comparison of their biological properties with widely used phosphorothioate modification was carried out. It was evaluated that mesyl oligonucleotides inhibit key

© С. К. Мирошниченко, О. А. Патутина, Е. А. Буракова, А. В. Сенькова, Б. П. Челобанов, Д. А. Стеценко, В. В. Власов, М. А. Зенкова, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке гранта Российского Научного фонда № 14-44-00068.

events of tumorigenesis *in vitro* and tumor growth *in vivo* more effectively in contrast to phosphorothioate analogs.

Поиск эффективных способов борьбы с онкологическими заболеваниями остаётся важнейшей задачей в настоящее время. На текущий момент одной из наиболее перспективных мишеней противораковой терапии являются короткие некодирующие молекулы — микроРНК. Поскольку они контролируют множество белковых мишеней, обеспечивающих протекание ключевых клеточных процессов, подавление активности микроРНК оказывает комплексное действие на многие события канцерогенеза. Для эффективного ингибирования функций микроРНК исследователи применяют синтетические антисмысловые олигонуклеотиды. Данные соединения комплементарно связываются и блокируют действие микроРНК, связанных с развитием заболеваний. Для увеличения продолжительности и эффективности действия антисмысловых олигонуклеотидов, исследователи вводят в состав соединений химические модификации оснований и межнуклеотидных связей. На данный момент в области разработки химических модификаций уже достигнуты значительные успехи, однако создание новых модифицированных соединений, обеспечивающих эффективное связывание и необратимую инактивацию терапевтической мишени всё ещё остаётся актуальной задачей в наши дни.

В данной работе были созданы и всесторонне исследованы олигонуклеотиды, содержащие в своём составе новую N-мезил-фосфорамидную модификацию межнуклеотидных связей. Биологические свойства разработанных олигонуклеотидов были сопоставлены с характеристиками олигонуклеотидов, содержащих широко используемую фосфотиоатную модификацию межнуклеотидных связей. В качестве терапевтической мишени была выбрана онкогенная микроРНК-21, являющаяся общепризнанным онкогеном, экспрессия которой нарушена во многих типах онкопатологий. Было выявлено, что мезильные олигонуклеотиды сочетают в себе такие характеристики как высокая аффинность к мишени, значительная стабильность в сыворотке, а также способность активировать фермент РНКазу H, катализирующую необратимую деградацию микроРНК в гетеродуплексах с олигонуклеотидами. Стоит отметить, что по всем перечисленным характеристикам мезильные олигонуклеотиды значительно превосходят фосфотиоатные аналоги.

Исследование биологической активности разработанных соединений в культуре клеток показало, что мезильные олигонуклеотиды снижают уровень микроРНК-21 в клетках меланомы B16 в 1.5 раза эффективнее, чем фосфотиоатные аналоги, оказывая более чем в 2 раза длительное ингибирование мишени. Эффективное подавление микроРНК-21 под действием ме-

зильных олигонуклеотидов отражается в специфической активации апоптоза, а также в снижении пролиферативного и миграционного потенциалов раковых клеток, которое в случае фосфотиоатных олигонуклеотидов в основном обеспечивается общей токсичностью данного типа модификации. В эксперименте *in vivo* было показано, что созданные мезильные олигонуклеотиды способствуют значительному торможению роста опухоли, и их эффект примерно в 5 раз превосходит ингибирующее действие фосфотиоатных олигонуклеотидов. Это даёт основание полагать, что мезильные олигонуклеотиды являются достойной альтернативой фосфотиоатно модифицированным олигонуклеотидам и могут в дальнейшем стать эффективным инструментом в терапии онкопатологий.

**293FT — МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГРИППА А *****293FT — A MODEL FOR STUDYING THE MOLECULAR
MECHANISMS OF INFLUENZA A VIRUS INFECTION**

Е. В. Можаяева^{1,2}, Г. А. Степанов^{1,2}, Е. С. Журавлев¹, Д. В. Семенов²,
Е. А. Балахонова¹, М. Ф. Касакин¹, Р. Шах Махмуд³, С. Ю. Маланин³,
Т. Ю. Григорьева³, М. В. Сергеева^{1,4}, А. Б. Комиссаров^{1,4}

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

² *Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

³ *Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, Россия*

⁴ *Научно-исследовательский институт гриппа
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия*

E. V. Mozhaeva^{1,2}, G. A. Stepanov^{1,2}, E. S. Juravlev¹, D. V. Semenov¹,
E. A. Balakhonova¹, M. F. Kasakin¹, R. Shah Mahmud³, S. J. Malanin³,
T. V. Grigoreva³, M. V. Sergeeva^{1,4}, A. B. Komissarov^{1,4}

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

² *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

³ *Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia*

⁴ *Research Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of Russian Federation,
Saint-Petersburg, Russia*

E-mail: mozhayeva.alena@gmail.com,
stepanovga@niboch.nsc.ru

Аннотация

Вирус гриппа А является респираторным патогеном и периодически вызывает эпидемии у людей, а также свиней, птиц и других животных. Отличительной чертой

© Е. В. Можаяева, Г. А. Степанов, Е. С. Журавлев, Д. В. Семенов, Е. А. Балахонова, М. Ф. Касакин, Р. Шах Махмуд, С. Ю. Маланин, Т. Ю. Григорьева, М. В. Сергеева, А. Б. Комиссаров, 2018.

* Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №18-75-10069).

данного вируса является его изменчивость как в антигенности, так и в патогенности. В настоящее время во всем мире для защиты населения от инфекции вирусом гриппа используют инактивированные и субъединичные формы вакцин, полученные с использованием куриных эмбрионов. Применение культур клеток в производстве вакцин позволит устранить ряд недостатков стандартной технологии, а также сделать производство более экономичным. В качестве модели для исследования молекулярных механизмов инфекции вируса гриппа была выбрана клеточная линия 293FT. Были проведены этапы анализа дифференциальной экспрессии генов в клетках в условиях заражения вирусом гриппа А, кроме того выявлены изменения в уровне ряда микроРНК, а также в представленности модифицированных компонентов в составе основных классов РНК. Далее была предложена стратегия направленного нокаута генов-мишеней для создания клеточных линий, перmissive к различным штаммам вируса гриппа.

Abstract

Influenza A virus (IAV) is a respiratory pathogen, which periodically causes epidemics in humans, and also pigs, birds and other animals. Variability in antigenicity and pathogenicity is a distinctive feature of IAV. Currently, in the whole world inactivated and subunit forms of vaccines obtained by using chicken embryos are used to protect the population from infection caused by the IAV. Application of cell cultures for vaccines production will eliminate a number of problems of standard technologies, and will make production more economical. The 293FT cell line was chosen as a model for studying the molecular mechanisms of influenza infections. An analyze of the differential expression of genes in cells under conditions of IAV infection were made, in addition, changes in the level of a number of microRNAs were revealed, as well as in the representation of modified nucleosides as a part of the main RNA classes. Further, a strategy of directed knock-out of target genes was proposed to create cell lines permissive to various strains of the IAV.

Вирус гриппа А относится к семейству Orthomyxoviridae и включает в себя множество штаммов с различными патогенными профилями. Поскольку получение вакцин путем накопления вирионов в развивающихся куриных эмбрионов весьма трудоемко, а сами вакцины нуждаются в ежегодной корректировке из-за антигенного дрейфа поверхностных гликопротеинов вируса, существует потребность в разработке более современных подходов для производства вакцин. Применение культуры клеток в производстве вакцины позволит существенно упростить технологию производства, а использование бессывороточной питательной среды полностью исключит не только аллергические реакции вакцинированных на белки куриных яиц, но также возможное заражение посторонними вирусами, микоплазмами и прионами, содержащимися в продуктах животных. Актуальность работы состоит в изучении молекулярных путей развития вируса гриппа в клетках человека. Таким образом, целью данной работы являлось определение из-

менений в путях регуляции экспрессии генов в клетках человека 293FT при инфицировании вирусом гриппа А.

Для оценки изменений в путях регуляции экспрессии генов в клетках человека в условиях заражения вирусом гриппа был проведен анализ дифференциальной экспрессии генов методом массового параллельного секвенирования на платформе Illumina NextSeq. Было установлено, что через 12 часов после заражения вирусом гриппа происходит достоверное изменение уровня экспрессии 42 генов (Adj. p-value < 0.05). Далее было проведено обогащение по GO-терминам, результаты которого свидетельствуют об участии данной группы генов в активации иммунного ответа и каскадов апоптоза в условиях развития инфекции.

Массовое параллельное секвенирование фракции коротких форм РНК через 8 часов после заражения выявило изменения в уровне 57 форм (Adj. p-value < 0.05). Было показано, что 21 форма относится к группе микроРНК, и 21 форма — к группе малых ядрышковых РНК (мяоРНК), которые были сгруппированы в функциональные блоки, отвечающие за регуляцию клеточного цикла, а также активацию апоптоза. Полученный результат указывает на участие систем пост-транскрипционной регуляции созревания рРНК и трансляции мРНК в контроле вирусной инфекции в клетках человека.

Отдельным фундаментальным вопросом является регуляция механизмов модификации РНК в клетках человека в условиях вирусной инфекции. Для оценки изменения в уровне представленности модифицированных компонентов в составе суммарной РНК были определены условия исчерпывающего ферментативного гидролиза и последующего ВЭЖХ-МС/МС анализа. Был подготовлен ряд образцов клеток 293FT через 2–24 часа после заражения и проведена оценка вклада модифицированных нуклеотидов в составе основных классов РНК. Было установлено, что в клетках после заражения вирусом происходит резкое увеличение инозина через 6 часов после инфицирования, что хорошо согласуется с литературными данными. В тоже время было обнаружено, что происходит снижение уровня метилированной формы аденозина по N6-положению (m6A) в период 0–6 часов с последующим восстановлением уровня до исходного через 24 часа. Схожий эффект был обнаружен нами на клеточной линии карциномы легких человека A549.

Для создания клеточных линий человеческого происхождения для разработки вакцинных штаммов вируса гриппа была предложена стратегия рационального выбора гена для последующего CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута. Дальнейшие этапы включали конструирование специфичных протоспейсеров, нокаут гена-мишени путем внесения точечных разрывов

в гене, получение ДНК-конструкций для трансфекции с последующим отбором моноклонов, характеристика мутаций методом Сэнгера и отбор клонов, содержащих мутации, обеспечивающий сдвиг рамки считывания. Подтверждение изменений в уровне экспрессии генов-мишеней в полученных модифицированных линиях проводили методом вестерн-блота. Таким образом были получены клеточные линии с охарактеризованными мутациями генов-мишеней и продемонстрирована возможность повышения продуктивности таких линий по отношению к вирусу гриппа.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRE/LOXP ДЛЯ ИНДУКЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ГЕНОМЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

APPLICATION OF CRE/LOXP SYSTEM FOR INDUCTION OF MULTIPLE CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN THE HUMAN GENOME

Р. В. Мунгалов^{1,2}, В. С. Фишман², А. А. Хабарова²

¹ *Новосибирский государственный университет, НГУ*

² *Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН*

R. V. Mungalov^{1,2}, V. S. Fishman², A. A. Khabarova²

¹ *Novosibirsk State University, NSU*

² *ICG RB RAS*

Аннотация

Человеческий геном на 99 % состоит из некодирующих элементов и лишь 1 % кодирует белки. И если роль генов по большей мере известна, то функции некодирующей части генома до сих пор остаётся неизвестной. Существующих методов молекулярной и эволюционной биологии оказывается недостаточно для понимания роли всей ДНК. В данном проекте мы разработали две принципиально разные стратегии поиска функциональных элементов человеческого генома. В основе каждой из них лежит принцип действия Cre/LoxP-системы.

Abstract

The human genome consist of noncoding elements on 99 %, while protein-coding part of the human genome is only about 1 %. Suppose, that we know role of genes, but the function of protein-noncoding part of the genome is unknown for us. There are some methods of molecular and evolutionary biology, but it's not enough to answer the question about functionality of all these elements. In this project we have developed two different strategies for identification of functional elements in human genome. At the core of each one lays operating principle of Cre/LoxP-system.

В данной работе нами проведены первые шаги к созданию новой скрининговой системы для выявления функциональных элементов в геноме человека. Метод основан на введении в геном множественных LoxP-сайтов

с последующей индукцией хромосомных перестроек при помощи Cre/LoxP системы и далее, за счёт искусственной селекции, обогащении геномов клеток функциональными элементами. Интеграция LoxP-сайтов в геном осуществляется с использованием лентивирусных векторов. Схема эксперимента «Минимальный геном» представлена на рис. 1.

Оценки эффективности встройки вируса в геном, проведенные с помощью количественной ПЦР, позволили оценить количество интеграций LoxP-сайта в среднем на клетку, что составило ~50 событий в масштабах всего генома. Мы также показали, что концентрирование вирусов позволяет значительно увеличить количество провирусных интеграций.

В качестве системы для направленной селекции клеток на уменьшение контента ДНК мы использовали прижизненный краситель Vybrant DyeCycle, который позволяет окрашивать ДНК клеток и отсортировать ту часть популяции, у которой геном был редуцирован. Однако тестовые эксперименты с красителем показали его способность детектировать лишь существенную разницу в количестве ДНК, соизмеримую с плоидностью клеток, но не хромосомные делеции. На данный момент мы разрабатываем альтернативную стратегию поиска функциональных элементов генома. Принципиальным отличием новой стратегии от первоначальной является масштаб планируемых

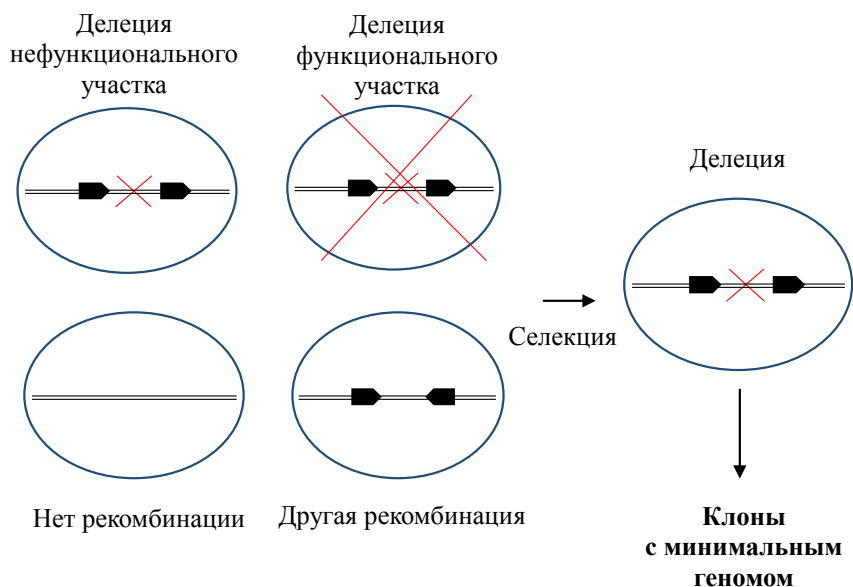


Рис. 1. Схема эксперимента «Минимальный геном»

делеций, а именно получение как можно большего разнообразия делеций в большой популяции клеток. Тогда как первая стратегия предполагала максимально возможное уменьшение генома до момента получения нескольких клонов, геномы которых будут сильно редуцированы и обогащены функциональными элементами. При этом не обязательно вносить огромное число случайных делеций в один и тот же геном, достаточно нескольких событий в каждой клетке. Информативность метода будет достигаться за счёт разнообразия малого числа делеций, индуцированных во множестве клеток.

Для идентификации делеций нами был разработан молекулярный метод, который заключается в следующем. После событий рекомбинаций в геноме клеток человека, индуцируемых Cre/LoxP-системой, из клеток выделяется геномная ДНК и гидролизуется короткошепщей эндонуклеазой рестрикции (сайт отсутствует в конструкции, несущей LoxP-сайт). Далее полученные фрагменты ДНК лигируются в условиях разбавления, что приведёт к появлению кольцевых молекул (фрагменты лигируются сами на себя). Конструкции с LoxP-сайтами несут по одному из двух вариантов уникальных олигонуклеотидов, каждый из которых находится по одну сторону от LoxP-сайта. Таким образом, после акта рекомбинации участки ДНК, содержащие конструкции с LoxP-сайтами и разными олигонуклеотидами будут сближаться и, используя последние в качестве праймеров для ПЦР, а также после массового параллельного секвенирования можно определять участки генома, где произошли рекомбинации. Следовательно, маловероятно, что данные участки несут важную функциональную роль для обеспечения жизнедеятельности клетки. Таким образом, в данном эксперименте нас интересует отрицательный результат, то есть те участки ДНК, которые мы не наблюдаем, а значит клетки, в которых они были делетированы, погибли на начальном этапе эксперимента. Данные участки генома подлежат более целенаправленному изучению. Схема эксперимента «Смысловые кольца» проиллюстрирована на рис. 2.

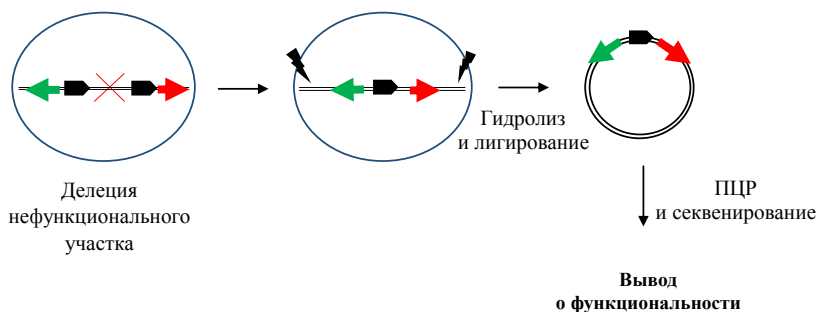


Рис. 2. Схема эксперимента «Смысловые кольца»

Литература

1. Kellis, M. et al. Defining functional DNA elements in the human genome // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014, №111 (17). p. 6131–6138
2. Sauer, B., and N. Henderson. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1 // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1988, №85 (14). p. 5166–70
3. <https://www.addgene.org/cre-lox> (Некоммерческое хранилище плазмид Addgene.org)

**АПОЛИПОПРОТЕИН А-1 В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА
УЧАСТВУЕТ В ЗАХВАТЕ АЦЕТИЛИРОВАННЫХ
ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ**

MACROPHAGE APOLIPOPROTEIN A-I PARTICIPATES
IN ACETYLATED LOW DENSITY LIPOPROTEIN UPTAKE
BY HUMAN MACROPHAGES

Е. В. Некрасова, А. А. Никитин, В. С. Шавва, С. В. Орлов

*ФГБНУ Институт экспериментальной медицины,
отдел биохимии
Санкт-Петербургский государственный университет,
кафедра эмбриологии*

E. V. Nekrasova, A. A. Nikitin, V. S. Shavva, S. V. Orlov

*¹ Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine, Russian
Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia*

*² Department of Embryology, St. Petersburg State University,
St. Petersburg, Russia*

E-mail: katherina.nekrasova@gmail.com

Аннотация

Аполипопротеин А-1 человека является главным белком липопротеинов высокой плотности и обладает атеропротекторными свойствами. Ранее нами было показано, что ген АпоА-1 экспрессируется в человеческих макрофагах.

Abstract

Human Apolipoprotein A-I is a core component of high density lipoprotein (HDL) particles that harbors anti-atherosclerotic functions. Earlier we have shown that apoA-I gene is expressed in human macrophages.

Objective

Given the importance of apoA-I for protection against the development of atherosclerosis and metabolic syndrome we have studied the potential functions of apoA-I expressed in human macrophages.

Methods

Real Time RT-PCR, FACS, isolation of primary human monocytes.

Results

Earlier we have shown that human macrophage population is divided in apoA-I-rich and apoA-I poor subgroups. FACS analysis revealed that apoA-I-rich macrophages take up significantly more acetylated LDL (acLDL) than apoA-I-poor macrophages. Treatment of human PBMC with siRNA against apoA-I or ABCA1 revealed that apoA-I or ABCA1 knock down leads to the decrease of surface LOX-1 scavenger receptor and LOX-1 mRNA level, yet had no effect on surface concentration of CD36 or SR-A. Administration of recombinant apoA-I or human HDL to PBMC treated with siRNA against apoA-I or ABCA1 rescued LOX-1 surface level. To probe the signaling pathways known to be activated by apoA-I/ABCA1 that can be involved in the apoA-I-dependent regulation of LOX-1 expression, we treated THP-1-derived macrophages with activators or inhibitors of different signaling pathways. PKA activator Forskolin and PKC activator PMA increased LOX-1 gene expression, while JNK inhibitor SP600125 downregulated LOX-1 gene activity. In contrast, MEK1/2 inhibitor U0126 and NF- κ B inhibitor QNZ displayed no effect.

Conclusion

Macrophage apoA-I and ABCA1 play a role in acLDL uptake through the regulation of LOX-1 expression.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ К САМОАССОЦИИИ
ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ*****ANALYSIS OF THE SELF-ASSEMBLY
OF THE OLIGONUCLEOTIDES WITH DODECYL GROUPS**

А. С. Павлова, М. С. Купрюшкин

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

A. S. Pavlova, M. S. Kupryushkin

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS,
Novosibirsk, Russian Federation*

Аннотация

Интерес к введению в нуклеиновые кислоты (НК) функциональных группировок остатков алифатических углеводов, липидов или жирных кислот с недавнего времени возрос ввиду способности данных групп увеличивать проникновение в клетки соответствующих НК и оказываемый ими антисенс эффект. В данной работе были исследованы свойства самосборки синтезированных додецил-содержащих олигонуклеотидных конъюгатов (ДОК) с помощью методов гель-электрофореза, анализа интенсивности флуоресценции, атомно-силовой микроскопии (АСМ) и динамического рассеяния света (ДРС). Показано, что такие амфифильные ДОК способны формировать мицеллоподобные частицы размером от 30 до 100 нм и обладают более высоким сродством к бычьему сывороточному альбумину по сравнению с олигонуклеотидом, не содержащим данных функциональных группировок. Продемонстрирован потенциал ДОК для использования в качестве средства доставки лекарственных препаратов.

Abstract

Interest in functionalizing nucleic acids (NAs) with aliphatic groups, lipid or fatty acids chains has recently grown due to the ability of these groups to improve cellular uptake and antisense effect of the corresponding NAs. In this report we investigated the self-assembly properties of synthesized dodecyl-oligonucleotide conjugates (DOCs) by means of gel electrophoresis, fluorescence techniques, atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS). Experimental results showed that these amphiphilic DOCs can form micellar particles with small size of 30 to 100 nm and have a higher affinity for association with bovine serum albumin in comparison with non functionalizing oligonucleotide, which point to their potential for the use as the drug delivery vehicles.

В настоящее время использование синтетических олигонуклеотидов, содержащих остатки алифатических углеводов, липидов или жирных кислот является одним из способов улучшения доставки функционально значимых НК [1]. Липофильная группировка служит так называемым «якорем» для закрепления таких конъюгатов на липидном бислое клеточных мембран, что позволяет рассматривать данные соединения как средства доставки, например, НК-аптамеров на поверхность клеток [2]. Кроме того, как амфифильные соединения такие конъюгаты способны к самоассоциации в водных и солевых растворах с образованием мицелл, как правило, не превышающих 100 нм [1]. Благодаря небольшому размеру, хорошей биологической совместимости и способности к удержанию и транспортировке внутри своего гидрофобного кодра различных низкомолекулярных плохо растворимых соединений, к числу которых принадлежат некоторые лекарственные препараты, такие мицеллоподобные структуры особенно интересуют ученых всего мира.

Ранее в нашей лаборатории была разработана методика синтеза додецил-содержащих олигонуклеотидных конъюгатов (ДОК) [3].

Целью данной работы было исследование свойств некоторых ДОК и их дуплексов с комплементарными олигонуклеотидами к самоассоциации.

Было показано, что ДОК способны формировать мицеллоподобные частицы размером от 30 до 100 нм и их размер зависит от длины олигонуклеотидной части конъюгата. ДОК обладают более высоким сродством к бычьему сывороточному альбумину по сравнению с олигонуклеотидом, не содержащим данных функциональных группировок. Также продемонстрировано тушение флюоресценции остатка 6-FAM при его расположении на одном конце с додецильными группировками в условиях образования мицелл, то есть можно предположить, что гидрофобное ядро располагается внутри, а гидрофильная олигонуклеотидная часть — снаружи формируемых частиц. Данные результаты позволяют рассматривать ДОК как перспективную платформу для создания средств доставки лекарственных препаратов.

Литература

1. Juliano R. L. The Delivery of Therapeutic Oligonucleotides // *Nucleic Acids Research*. 2016. V. 44(14). P. 6518–6548.
2. Liu H. et al. DNA Based Micelles: Synthesis, Micellar Properties and Size-dependent Cell Permeability // *Chemistry*. 2010. V. 16(12). P. 3791–3797.
3. Kupryushkin M. S. et al. Efficient Functionalization of Oligonucleotides by New Achiral Nonnucleosidic Monomers // *Organic Letters*. 2014. V. 16(11). P. 2842–2845.

**ЭКСПРЕССИЯ МРНК ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ
КАТЕХОЛАМИНОВ, УРОВЕНЬ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ
В ПОЛОСАТОМ ТЕЛЕ, СРЕДНЕМ И ПРОДОЛГОВАТОМ
МОЗГЕ И РЕАКЦИЯ ПРЕСТИМУЛЬНОГО ТОРМОЖЕНИЯ
У КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КАТАТОНИЕЙ***

GENES EXPRESSION OF CATECHOLAMINE SYSTEM ENZYMES,
THE LEVEL OF NEUROTRANSMITTERS
IN THE STRIATUM, MIDBRAIN AND MEDULLA OBLONGATA
AND THE REACTION OF PREPULSE INHIBITION
IN RATS WITH GENETIC CATATONIA

В. С. Пλεκанчук^{1,2}, Т. В. Латышева³, О. И. Прокудина¹,
Т. А. Алехина¹, М. А. Рязанова^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский институт физиологии
и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

V. Plekanchuk^{1,2}, T. Latysheva³, O. Prokudina¹,
T. Alekhina¹, M. Ryazanova^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine,
Novosibirsk, Russia

E-mail: lada9604@mail.ru

Аннотация

Крысы линии ГК (аббревиатура от слов «генетическая» и «кататония») пред-
расположены к реакциям кататонического застывания. Данный тип кататонических
реакций характерен для людей с шизофренией, что дало основание предполагать,
что крысы линии ГК, по крайней мере частично воспроизводят психопатологию че-
ловека. В связи с этим актуально исследование престаимпульного торможения (PPI)

© В. С. Плеканчук, Т. В. Латышева, О. И. Прокудина, Т. А. Алехина, М. А. Рязанова, 2018.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №16-04-01325).

у крыс ГК, как показателя фильтрации сенсомоторной информации, который нарушен в большей степени при шизофрении, а также при некоторых других психиатрических заболеваниях [1], [2]. Известно также, что дофаминергическая система мозга играет важную роль в проявлении кататонии и её влияние комплексное. Норадренергическая система может модулировать работу дофаминергической, а также непосредственно влиять на двигательную активность и эмоциональное состояние. Исследовали PPI у крыс ГК, экспрессию генов тирозингидроксилазы (*Th*), катехол-О-метилтрансферазы (*Comt*) и гена моноаминоксидазы А (*Maoa*), а также оценивали содержание норадреналина, дофамина и ДОФАК в структурах мозга интактных крыс инбредной линии крыс ГК. Достоверно более низкий уровень претимпульного торможения был показан как при силе претимула 75 дБ ($p < 0.001$), так и при 85 дБ ($p < 0.001$). Выявлена достоверно низкая экспрессия гена моноаминоксидазы А (*Maoa*) в полосатом теле у крыс ГК. Кроме того, показан высокий уровень норадреналина в полосатом теле и среднем мозге по сравнению с контрольной линией крыс WAG. Изменения в уровне норадреналина в мозге могут вносить вклад в высокую возбудимость и «нервность», которые были показаны ранее у крыс ГК [3], как и реакции «застывания». Выявленное снижение PPI у крыс ГК свидетельствует в пользу функционального сходства линии ГК, как генетической модели психопатологии, с прототипом.

Abstract

The GC rats strain (an abbreviation from words «genetic» and «catatonia») are predisposed to catatonic freezing reactions. This type of catatonic reactions is observed in schizophrenia, which give the reason to assume that GC rats reproduce human psychopathology at least partially. In connection with this, it is important to study the prepulse inhibition (PPI) in GC rats as an indicator of sensorimotor information filtration, which is disrupted in schizophrenia, as well as in some other psychiatric diseases [1], [2]. It is also known that the brain dopaminergic system plays an important role in the manifestation of catatonia and its effect is a complex. Noradrenergic system can modulate the dopaminergic function, and also directly affect on motor activity and emotional state. PPI was studied in GC rats. Expression of tyrosine hydroxylase (*Th*), catecholamine-O-methyltransferase (*Comt*) and of monoamine oxidase A (*Maoa*) genes, as well as norepinephrine, dopamine and DOPAC levels was study in striatum, midbrain and medulla oblongata of intact rats GC rats. A significantly lower level of PPI was shown with a prepulse power of 75 dB ($p < 0.001$), and at 85 dB ($p < 0.001$). The low expression of mRNA *Maoa* was observed in striatum of GC rats. In addition, a high level of norepinephrine in striatum and midbrain of GC rats was shown compared with the control WAG rats. The revealed changes in the level of norepinephrine in the brain can contribute to the high excitability and «nervosity» of GC rats, which was shown before [3] as well as «freezing» reactions. The revealed reduced level of PPI of GC rats count in favor of functional similarity of GC line (as a genetic model of psychopathology) with the prototype (psychopathology itself).

Целью работы было исследование реакции престаимпульного торможения, а также оценка экспрессии мРНК генов синтеза (*Th*) и деградации катехоламинов (*Comt*, *Maoa*), и определение содержания катехоламинов и ДО-ФУК в полосатом теле, продолговатом и среднем мозге у крыс линии ГК.

Методы

Исследование престаимпульного торможения (prepulse inhibition, PPI) у крыс ГК и WAG проводили в установке TSE StartleResponseSystem (Germany), количество мРНК исследуемых генов в структурах мозга крыс (полосатое тело, средний и продолговатый мозг) определяли методом ПЦР в реальном времени, количество катехоламинов измеряли с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, статистическая обработка результатов проведена с помощью пакета программ «Statistica 6.0».

Результаты

Престаимпульное торможение (prepulse inhibition, PPI) — это снижение моторной реакции организма рефлекса вздрагивания в ответ на сильный резкий стимул, обычно звуковой (импульс), при наличии слабого предварительного подпорогового звукового стимула (преимпульс). PPI является важным показателем способности нервной системы к сенсомоторной фильтрации. Дефицит PPI наблюдается у пациентов с шизофренией и другими психическими расстройствами [4]. Выраженность реакции PPI связана в том числе и с дофаминергической системой мозга, в частности с уровнем экспрессии гена *Comt* [5]. Норадренергическая система мозга может модулировать работу дофаминергической, а также непосредственно влиять на двигательную активность и эмоциональное состояние. Основным центром синтеза норадреналина является Голубое пятно ствола мозга, тем самым регулируя уровень возбуждения, тревожности, страха и двигательные реакции. Полосатое тело является важной базальной структурой, дофаминовая функция которой оказывает влияние на патогенез шизофрении [6], депрессии и каталепсии [7].

Выявлено снижение уровня PPI у крыс инбредной линии ГК по сравнению с крысами линии WAG. Достоверно более низкий уровень престаимпульного торможения показан как при силе престаимула 75 дБ (по Манн-Уитни: $U=24.0$, $p<0.001$), так и при 85 дБ (по Манн-Уитни: $U=25.0$, $p<0.001$). В полосатом теле показано снижение экспрессии мРНК гена *Maoa* у крыс с генетической кататонией ($p<0,05$). Выявленные изменения в экспрессии *Maoa* в полосатом теле могут указывать на недостаточную скорость утилизации катехоламинов в полосатом теле, что согласуется с полученными данными о повышенном содержании норадреналина у крыс ГК в данной структуре ($p<0,05$). Повышенное содержание норадреналина также показало-

но для среднего мозга у крыс ГК ($p < 0,01$), однако экспрессия исследуемых генов в этой структуре не отличалась у крыс ГК и WAG. Возможно, у крыс с генетической кататонией наблюдаемое нарушение баланса нейромедиаторов в среднем мозге ассоциировано не с количеством мРНК генов *Th*, *Comt*, *Maoa*, а с изменением других параметров, например с изменением активности этих ферментов. Высокоэффективная жидкостная хроматография не выявила различий в содержании дофамина и ДОФУК в исследуемых структурах мозга крыс ГК по сравнению с контролем.

Выводы

Высокий уровень норадреналина в полосатом теле крыс ГК может быть обусловлен низкой экспрессией мРНК *Maoa* в этой структуре, однако, увеличение уровня норадреналина в среднем мозге не связано с изменениями в экспрессии мРНК исследованных генов. Выявленные изменения уровня норадреналина в мозге могут способствовать увеличению возбудимости и «нервности» крыс ГК, которые были показаны ранее [3] наряду с акинетическими реакциями «торможения». Сниженная реакция претимпульного торможения свидетельствуют в пользу функционального сходства линии ГК, как генетической модели психопатологии, с прототипом.

Литература

1. J. P. Vargas et al, Animal Models of Maladaptive Traits: Disorders in Sensorimotor Gating and Attentional Quantifiable Responses as Possible Endophenotypes, *Front. Psychol.*, vol. 7, p. 206, 2016.
2. N. R. Swerdlow et al, Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research, *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 199, no. 3, pp. 331–388, 2008.
3. М. А. Рязанова и др., Увеличение доли ‘нервных’ животных в ходе селекции на кататонию: участие в кататонических реакциях центральных адренорецепторов, *Генетика*. 2012. Т. 48. № 11. С. 1–8, 2012.
4. I. Martinez-Gras et al., The relationship between prepulse inhibition and general psychopathology in patients with schizophrenia treated with long-acting risperidone, *Schizophr. Res.*, vol. 115, no. 2–3, pp. 215–221, 2009.
5. N. R. Swerdlow et al, Opposite effects of tolcapone on amphetamine-disrupted startle gating in low vs. high COMT-expressing rat strains, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 106, pp. 128–131, 2013.
6. S. M. Stahl, Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate, *CNS Spectr.*, vol. 23, no. 03, pp. 187–191, 2018.
7. R. Vajdi-Hokmabad et al, Modafinil Improves Catalepsy in a Rat 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson’s Disease; Possible Involvement of Dopaminergic Neurotransmission, *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 7, no. 3, pp. 359–365, 2017.

ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА Y, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ВИРУС МАРБУРГ*

MARBURG VIRUS-NEUTRALIZING IGYS

О. А. Полежаева, Д. Н. Щербаков, А. В. Зыбкина

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

O. A. Polezhaeva, D. N. Scherbakov, A. V. Zybkina

FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор, Russia

Аннотация

Была проведена работа по получению иммуноглобулинов класса Y, нейтрализующих вирус Марбург. В результате нами были получены препараты антител способные нейтрализовать псевдовирусные частицы вируса Марбург при разведении 1/256.

Abstract

Our study aimed at developing chicken immunization schedule to produce MARV-neutralizing IgYs. Resulting IgYs were isolated and tested in virus neutralization assay with VLPs. We selected IgYs that neutralize VLPs in 1/256 dilution.

Согласно международной классификации, вирус Марбург относится к семейству филовирусов отряд *Mononegavirales*. Вирус Марбург вызывает тяжелую геморрагическую лихорадку у людей. Уровень смертности в очагах лихорадки Марбург варьируется от 24 до 88 %. Начиная с середины 80-х годов ведутся поиски терапевтических средств для борьбы с филовирусами. Предложен ряд подходов, таких как постконтактные вакцины, мРНК, олигомеры и моноклональные антитела. Последние, по показателям безопасности и специфичности действия, несомненно занимают лидирующие позиции.

Первым этапом получения моноклональных антител является получение разнообразия специфических иммуноглобулинов в организме животного. Наша работа направлена на разработку эффективной схемы иммунизации кур, для получения разнообразия IgY антител, нейтрализующего вирус Марбург. На первом этапе на основе рабдовирусной системы нами были получены функциональные вирусоподобные частицы (ВПЧ), псевдотипи-

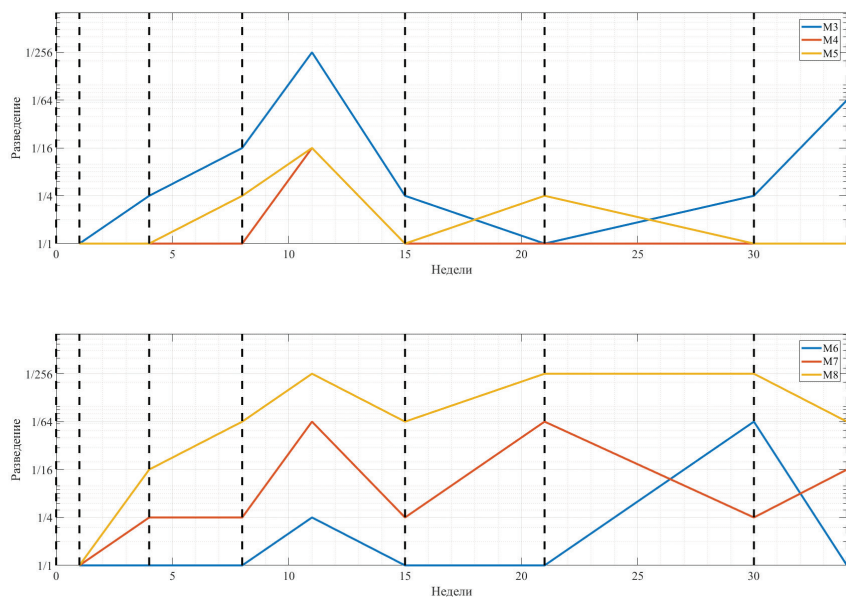
© О. А. Полежаева, Д. Н. Щербаков, А. В. Зыбкина, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке РФФИ в рамках научного проекта №18-34-00512 мол_а.

График иммунизации



Рис. 1. Схема иммунизации



рованные поверхностным гликопротеином (GP) вируса Марбург. Функциональную активность ВПЧ определяли на клетках HEK293T. Сигнал свечения прямо пропорционален количеству зараженных клеток и определяется в относительных люциферазных единицах (RLU).

Для иммунизации было сформировано две группы кур — первой группе вводились очищенные ВПЧ в концентрации $1,4 \times 10^7$ RLU внутримышечно, второй группе вводилось то же количество ВПЧ с неполным адьювантом Фрейнда. Промежуток между иммунизациями составляет 3 недели. После шести иммунизаций проводили бустирующую иммунизацию обеих групп смесью ВПЧ. Использовали смесь, состоящая на 50 % из рабдовирусных частиц, несущих на своей поверхности GP штамма *Popp* с делецией муциноподобного домена и на 50 % из лентивирусных частиц, несущих на своей поверхности GP штамма *DRC* с делецией муциноподобного домена. Схема иммунизации представлена на рис. 1.

IgY выделялись методом изоэлектрического осаждения. Проверку вируснейтрализации проводили с помощью псевдовиральной системы (рис. 2).

Появление нейтрализующих антител было зафиксировано после первой иммунизации. Наибольший уровень нейтрализации (1/256) был достигнут после третьей иммунизации.

В результате были получены препараты антител, нейтрализующие ВПЧ в разведении 1/256. Более высокие титры нейтрализующих антител накапливались в желтках птиц, иммунизированных по схеме с добавлением неполного адьюванта Фрейнда.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ
СТРОМА-АССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ
В АЛЛОГРАФТНЫХ МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ МЫШИ***

**THE STUDY OF THE EXPRESSION OF STROMA-ASSOCIATED GENES
IN MOUSE ALLOGRAFT TUMOR MODELS**

А. В. Полуконова, Д. А. Дидыч, Е. Д. Свердлов

*ФГБУН Институт биоорганической химии
им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук*

A. V. Polukonova, D. A. Didych, E. D. Sverdlov

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
of the Russian Academy of Sciences*

E-mail: polukonova.av@gmail.com

Аннотация

Данная работа посвящена анализу экспрессии ряда стромы-ассоциированных генов в трех аллогraftных моделях опухолей мыши. Особое внимание в работе уделено потенциальным маркерам опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ). Полученные нами результаты подтверждают высокую специфичность экспрессии большинства исследуемых генов в клетках опухолевой стромы. Сравнение экспрессии стромы-ассоциированных генов в опухолях разных моделей указывает на разную степень развития в них стромального компонента. В дальнейшем анализ экспрессии исследованных в работе генов планируется использовать для характеристики отдельных популяций ОАФ, выделяемых из опухолей.

Abstract

This work is devoted to the study of the expression of potential stromal markers in three mouse allograft tumor models. Especially, our attention was focused on the potential markers of cancer-associated fibroblasts (CAFs). Our results confirm that most of the studied genes have the high specificity of expression in tumor stroma cells. Comparison of the expression of stroma-associated genes in different tumor models indicates a different degree of stromal component development. In the future, the gene expression analysis performed in this work is planned to be used to characterize the individual populations of CAFs isolated from tumors.

© А. В. Полуконова, Д. А. Дидыч, Е. Д. Свердлов, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00190.

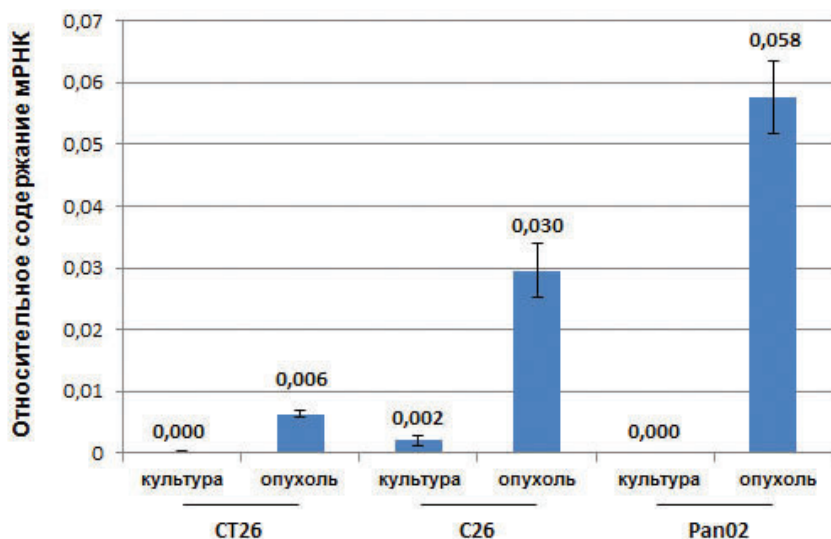
В большинстве солидных опухолей основным компонентом стромы являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ), взаимодействия которых с раковыми клетками и клетками иммунной системы, обеспечивают опухолевую прогрессию, инвазию, метастазирование, ангиогенез и уклонение опухоли от иммунного надзора. Благодаря различному происхождению, высокой пластичности и чувствительности к внешним сигналам, ОАФ характеризуются высокой меж- и внутриопухолевой гетерогенностью. Поэтому поиск специфичных генов и их сочетаний, позволяющих идентифицировать разные популяции ОАФ, представляется важной прикладной задачей.

В данной работе на основе литературных данных мы составили список потенциальных ОАФ-специфичных генов и провели анализ их экспрессии в трех аллогraftных моделях опухолей мыши.

Для исследования были выбраны как известные стандартные гены-маркеры ОАФ, (*Pdgfrb*, *Acta2*, *Fsp1/S100a4*, *Cspg4*, *Fap*) так и выбранные нами на основе литературных данных (*Saa3*, *Wnt2*, *Dpp4*, *S100a8*, *Kcnj15*, *Gjb2* и *Csf3*). В качестве дополнительных были исследованы и другие строма-ассоциированные гены, связанные с иммуномодуляторными активностями (*Il6*, *Il11*, *Ccl2*, *Cxcl12*, *Ox40*, *Ox40L*, *Nt5e*, *Cd276*, *Pdl2* и *Foxp3*). Для анализа использовали образцы тотальной РНК, выделенные из подкожно привитых опухолей мыши, полученных с использованием раковых линий: СТ26 (карцинома толстой кишки), С26 (карцинома толстой кишки) и Pan02/Panc02 (протоковая аденокарцинома поджелудочной железы). В качестве контрольных образцов использовали РНК, выделенные из клеток соответствующих раковых линий, культивируемых *in vitro*. Из обработанных ДНК-Казой I образцов РНК с применением метода рассеянной затравки были получены образцы кДНК, которые использовали для анализа экспрессии исследуемых генов методами «обычной» ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в «реальном времени». В качестве референсных генов использовали гены домашнего хозяйства *Psmb2* и *Psmb7*.

В результате работы нами были получены данные об относительном содержании мРНК строма-ассоциированных генов в образцах РНК, выделенных из клеток трех раковых линий, культивируемых *in vitro*, и из соответствующих им подкожно привитых мышинных опухолей. Мы показали, что в образцах из клеток, культивируемых *in vitro*, мРНК большинства исследованных генов либо не детектируются, либо их содержание незначительно по сравнению с образцами из опухолей. Эти данные свидетельствуют о возможной высокой специфичности их экспрессии в клетках стромы. Однако, мы допускаем, что после инокуляции раковых клеток под кожу в процессе формирования опухоли под воздействием сигналов микроокружения в ра-

ковых клетках может происходить и активация некоторых молчащих генов, и усиление уже активных генов.



Анализ экспрессии *Far* в подкожно прививаемых мышинных опухолях, полученных с использованием культур раковых клеток CT26, C26 и Pan02

Сравнение между собой опухолей разных моделей по содержанию мРНК строма-ассоциированных генов указывает на разную степень развития стромального компонента в опухолях. Интерпретируя полученные результаты на примере *Far*, который известен как высокоспецифичный ген, активный в популяциях *Far*-позитивных опухоль-ассоциированных фибробластах (см. рисунок), можно ожидать, что, в опухолях Pan02 количество *Far*-позитивных клеток значительно больше, чем в опухолях CT26. Похожая картина наблюдается и для таких генов как *Wnt2*, *Dpp4*, *Acta2*, *Saa3* и *S100a8*.

В дальнейшем анализ экспрессии исследованных в работе генов планируется использовать для характеристики отдельных популяций ОАФ, выделяемых из опухолей.

СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МОДЕЛИ (ЦГГ)_n ПОВТОРА И ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ *

(CGG)_n REPEAT MOLECULAR MODEL DEVELOPMENT AND STUDY IN EUKARIOTIC CELLS DURING ACTIVE TRANSCRIPTION

Я. В. Пурвиньш, И. В. Грищенко

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

Y. V. Purvinsh, I. V. Grishchenko

FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор, Russia

E-mail: yana.purvinsh@gmail.com

Аннотация

Синдром ломкой X-хромосомы является экспансионным заболеванием, которое развивается в результате экспансии (ЦГГ)_n повторов в 5'-UTR гена *FMR1*. Это приводит к гиперметилированию промотора и прекращению экспрессии данного гена. Вероятно, в механизм возникновения экспансии вовлечена репарация, ассоциированная с транскрипцией. Проведено исследование влияния активной транскрипции на экспансию в молекулярной модели (ЦГГ)_n повтора.

Abstract

The Fragile X syndrome is repeat expansion disorders that develops as a result of the expansion (CGG)_n repeats in the 5'-UTR of the *FMR1* gene. It leads to hypermethylation of the promoter and termination of the expression of this gene. Probably, the transcription-coupled repair is involved in the mechanism of expansion. Study of active transcription influence to expansion have been carried out on molecular model.

Одной из причин нестабильности генома является экспансия тринуклеотидных повторов. Данная мутация является причиной ряда нейродегенеративных заболеваний человека, таких как синдром ломкой X-хромосомы, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз и др. Она заключается в резком увеличении числа копий внутригенных последовательностей ДНК. Заболевания, связанные с экспансией повторов на сегодняшний день остаются неизлечимыми, а механизм возникновения — неизвестным. Синдром ломкой X-хромосомы является одним из распространенных экс-

пансионных заболеваний. Его развитие обуславливается увеличением повторов (ЦГГ)_n в 5'-UTR гена *FMRI*, что в свою очередь приводит к гиперметилированию промотора и как следствия прекращению экспрессии гена *FMRI* и резкому сокращению продукции белка FMRP. Данный белок является ответственным за нормальную дифференцировку и функционирование нейронов. Существует множество гипотез возникновения экспансии повторов, одна из них рассматривает репарацию ДНК, как основную причину. Для аллелей гена *FMRI* было показано, что уровень транскрипции значительно выше в аллелях с увеличенным повтором, что указывает на то, что репарация, ассоциированная с транскрипцией (TCR), вероятно, является одной из причин экспансии. Данные повторы способны формировать альтернативные вторичные структуры ДНК, которые затрудняют транскрипцию и репликацию. Образование таких структур приводит к остановке движения РНК-полимеразы II, что включает механизм TCR. При этом причиной экспансии повторов может являться проскальзывание ДНК-полимеразы в месте образования вторичных структур при TCR. Так как (ЦГГ)_n-повтор присутствует как в клетках пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, так и в клетках здоровых людей, однако его увеличение происходит только у пациентов, можно предположить, что экспансия повторов обусловлена вероятными нарушениями работы системы репарации именно у пациентов.

Целью нашей работы являлось создание молекулярной модели повтора (ЦГГ)_n длины, характерной для нормального аллеля гена *FMRI*, и исследование его экспансии при активной транскрипции в immortalized В-лимфоцитах пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы с помощью вектора, несущего соответствующую конструкцию. В ходе работы был сконструирован ДНК-вектор, содержащий вставку ЦГГ-повторов, была проверена его работоспособность и проведена трансфекция клеточных линий immortalized В-лимфоцитов пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и здорового контроля, а также исследовано изменение длины ЦГГ-повтора в векторе при активной транскрипции с течением времени.

НОВЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ РАДИОПРОТЕКТОРОВ ***A NEW APPROACH IN SEARCHING FOR RADIOPROTECTORS**

Г. С. Риттер^{1,2}, В. П. Николин¹, Н. А. Попова^{1,2},
П. Э. Кисаретова^{1,2}, Е. В. Долгова¹, А. С. Проскурина¹,
Е. А. Поттер¹, С. С. Кирикович¹, С. И. Байбородин¹,
О. С. Таранов³, Я. Р. Ефремов^{1,2}, Н. А. Колчанов¹, С. С. Богачев¹

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»

² ФГБОУВПО «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет»

³ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

G. S. Ritter, V. P. Nikolin, N. A. Popova, P. E. Kisaretova, E. V. Dolgova,
A. S. Proskurina, E. A. Potter, S. S. Kirikovich, S. I. Bayborodin,
O. S. Taranov, Y. R. Efremov, N. A. Kolchanov, S. S. Bogachev

E-mail: labmolbiol@mail.ru

Аннотация

Поиск новых средств профилактики острых радиационных поражений остается одной из актуальных научных задач современной радиобиологии. Это особенно актуально для решения проблемы защиты организма от сверхвысоких доз ионизирующего облучения. В данной работе представлен препарат с абсолютно новым механизмом радиозащитного действия, связанным с интернализацией экстраклеточных фрагментов РНК во внутренние компартменты стволовой гемопоэтической клетки и с последующим их участием в восстановительном репарационном процессе.

Abstract

The search for new means of prevention of acute radiation injuries remains one of the urgent scientific problems of modern radiobiology. This is especially true to solve the problem of protecting the body from ultra-high doses of ionizing radiation. This study presents a drug with a completely new mechanism of radioprotective action associated with the internalization of extracellular RNA fragments in the internal compartments of the stem hematopoietic cell and their participation in the restorative repair process.

© Г. С. Риттер, В. П. Николин, Н. А. Попова, П. Э. Кисаретова, Е. В. Долгова, А. С. Проскурина, Е. А. Поттер, С. С. Кирикович, С. И. Байбородин, О. С. Таранов, Я. Р. Ефремов, Н. А. Колчанов, С. С. Богачев, 2018.

* Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00205\18.

В предварительных тестах коммерчески доступный препарат дрожжевой РНК, показал на мышах линии СВА 100 % радиозащитный эффект при облучении летальной дозой в 9.4 Гр. Так же обнаружилось, что препарат дрожжевой РНК обладает пролонгированным радиопротекторным действием. Так биологические тесты показали, что при облучении, проводимом через 1 час и на 4 сутки после введения препарата РНК, к 70-ым суткам наблюдения выживает 100 %, а при облучении на 8 и 12 сутки до 60 % животных. Однако эффект не является прямолинейным, поскольку оказался неожиданным факт практически полной гибели экспериментальной группы мышей, облученных через сутки после введения препарата РНК (рис. 1).

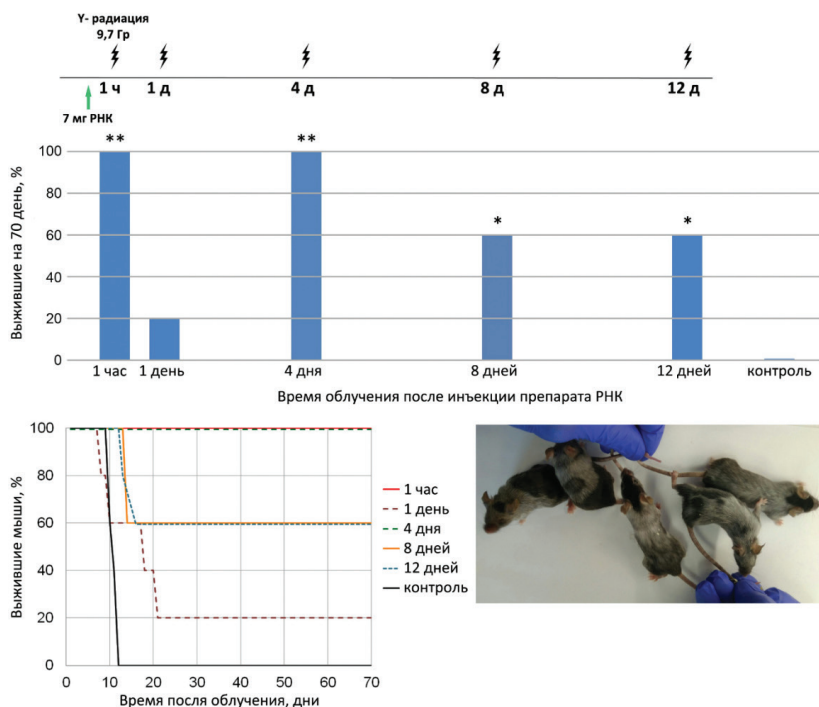


Рис. 1. Характеристика пролонгированного радиопротекторного действия препарата РНК, выделенной из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, при облучении в абсолютно летальной дозе 9.4 Гр. А) Схема эксперимента и диаграмма выживания мышей. Достоверность подсчитана с помощью критерия хи-квадрат в программе Statistica 10 относительно контрольной группы, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Б) График выживания экспериментальных групп. В) Животные, облученные на 4 сутки после введения радиопротектора РНК дрожжей, через 90 суток после облучения

В ходе аналитических исследований препарата суммарной РНК дрожжей обнаружилось, что в препарате суммарной РНК присутствует две четко разграниченные фракции, одна из которых элюируется с ГАП (гидроксиапатит) как одноцепочечная РНК при элюции 0.15 М PBS. Вторая фракция элюируется в условиях, характерных для двуцепочечных нуклеиновых кислот, при 0.25 М PBS. Дальнейшие исследования этой фракции показали, что ею является двуцепочечная РНК (дцРНК).

Проведенные эксперименты по оценке радиопротекторного действия обеих фракций свидетельствовали, что радиопротекторные свойства характерны только для фракции, элюирующейся в 0.25 М PBS. При этом количество вводимого препарата, необходимое для радиопротекторного действия, многократно сокращалось. Если для достижения 80–100%-го радиозащитного эффекта на одну мышь требуется 7–10 мг препарата суммарной РНК, то для полной защиты животного при абсолютно летальных дозах γ -облучения, хватает 160 мкг дцРНК.

Известно, что CD34+ клетки костного мозга (ККМ) представляют собой плюри/мультипотентные стволовые гемопоэтические предшественники. Цитологическое исследование, с использованием антител к мембранному белку CD34 и меченого флюорохромом двуцепочечного РНК-зонда, подтвердило присутствие двуцепочечной РНК в этих клетках (рис. 2.). Количество клеток, захвативших РНК-зонд оценивается в 0.01–0.025 % от общего числа

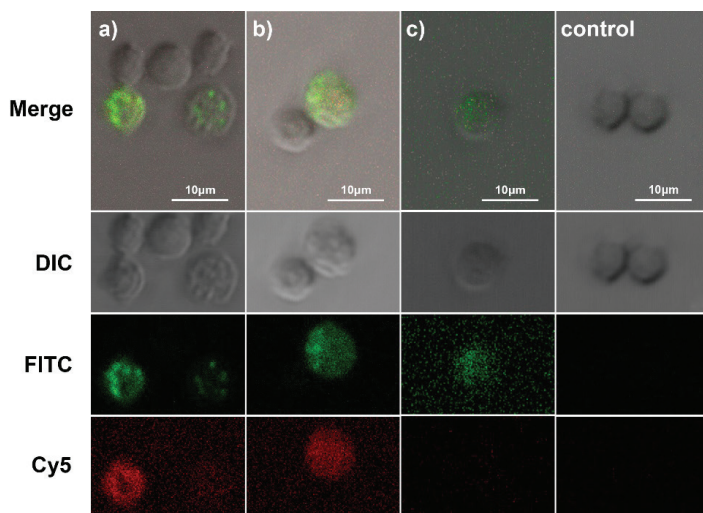


Рис. 2. Совместная локализация 36-FAM двуцепочечной РНК (FITC) и Cy5 CD34 антител (Cy5) в ККМ в системе *ex vivo*

ККМ, т. е. — порядка 5000 клеток. Несмотря на незначительный процент таких клеток, экспериментально определенное их количество, вполне достаточно для заселения паренхимы селезенки, где в различных экспериментах по радиопротекции детектируется до 40 селезеночных колоний (Likhacheva et al., 2007, настоящее исследование). Было установлено, что меченый РНК зонд уже через 30 минут полностью насыщает клетку, и при этом может находиться в клетке как минимум до 7 часов. Оценка доставки в разных системах свидетельствует, что в стволовые клетки крови интернализуются не деграданты молекулы РНК, а именно молекула исходного субстрата.

Мы предполагаем, что именно спасенные стволовые гемопоэтические клетки, мигрируя на периферию и достигнув селезенки и других лимфоидных органов, дают новый пул клеток, которые формируют новую кроветворную и иммунную систему, разрушенную в результате облучения.

Литература

1. Долгова Е. В., Николин В. П., Попова Н. А., Проскурина А. С. и др. Интернализация экзогенной ДНК во внутренние компартменты клеток костного мозга мышей // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012, том 16. № 2. С. 397–414.
2. Dolgova E. V., Efremov Y. R., Orishchenko K. E., Andrushkevich O. M. et al. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA // Gene, 2013, vol. 528. № 2. P. 74–83.
3. Dolgova E. V., Potter E. A., Proskurina A. S., Minkevich A. M. et al. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line // Stem cell research & therapy, 2016, vol. 7. № 1. P. 76.
4. Likhacheva A. S., Nikolin V. P., Popova N. A. et al. Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination with human DNA // Gene Ther Mol Biol, 2007, vol. 11. P. 185–202.

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ИММУНОГЕНОВ,
НЕСУЩИХ ЭПИТОПЫ, УЗНАВАЕМЫЕ
ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ ВИЧ-1 АНТИТЕЛАМИ ***

**INVESTIGATION OF THE ANTIGENIC PROPERTIES
OF IMMUNOGENES CARRIED WITH EPITHOPE RECOGNIZED
BY BROADLY NEUTRALIZING HIV-1 ANTIBODIES**

А. П. Рудометов¹, Н. Б. Андреева¹, Д. Н. Щербakov¹, А. Ю. Бакулина²,
А. Н. Чикаев³, О. Н. Каплина¹, Л. И. Карпенко¹

¹ *ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия*

² *Новосибирский государственный университет*

³ *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН*

A. P. Rudometov¹, N. B. Andreeva¹, D. N. Shcherbakov¹,
A. Yu. Bakulina¹, A. N. Chikaev³, O. N. Kaplina¹, L. I. Karpenko¹

¹ *FBRI SRC VB «Vector», Rospotrebnadzor, Russia*

² *Novosibirsk State University, Russia*

³ *IMCB SB RAS, Russia*

Аннотация

Несмотря на то, что вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) является одним из наиболее хорошо изученных вирусов, пока не удалось разработать эффективную вакцину против ВИЧ-1. В настоящее время доминирующим направлением является разработка иммуногенов, направленных на индукцию антител, способных нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (broadly neutralizing antibodies, bNAbs). В данной работе представлены результаты исследований по конструированию и изучению антигенных и иммуногенных свойств ВИЧ-иммуногенов, несущих эпитопы, узнаваемые bNAbs 2F5, 4E10, 10E8 и VRC01. Иммуногены были получены на основе 3-х белков-носителей: искусственного полиэпитопного белка TBI, корового белка вируса гепатита В (HBcAg) и белка YkuJ *Bacillus subtilis*.

Abstract

In spite of the fact that the human immunodeficiency virus type I (HIV-1) is one of the most well-studied viruses, it has not yet been possible to develop an effective vaccine

© А. П. Рудометов, Н. Б. Андреева, Д. Н. Щербakov, А. Ю. Бакулина, А. Н. Чикаев, О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, 2018.

* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Субъекта РФ Новосибирской области в рамках научного проекта № 18-44-543017 и при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00314.

against HIV-1. Currently, the dominant trend is the development of immunogens aimed at inducing antibodies capable of neutralizing a wide spectrum of HIV-1 isolates (broadly neutralizing antibodies, bNAbs). This paper presents the results of studies on the design and study of the antigenic and immunogenic properties of HIV-immunogens carrying epitopes recognized by bNAbs 2F5, 4E10, 10E8 and VRC01. Immunogens were obtained on the basis of 3 carrier proteins: an artificial polypeptide protein TBI, a hepatitis B core protein (HBcAg), and a YkuJ protein *Bacillus subtilis*.

Решением проблемы распространения ВИЧ-инфекции может стать применение эффективной профилактической вакцины. К сожалению, в результате высокой генетической и, как следствие, антигенной вариабельности ВИЧ-1, до сих пор не удалось создать иммуноген, способный индуцировать формирование протективного иммунного ответа против широкого разнообразия генетических вариантов вируса. Надежду на появление эффективной вакцины дало открытие антител, обладающих вируснейтрализующей активностью, в отношении широкого разнообразия изолятов ВИЧ-1. Их особенность заключается в том, что они взаимодействуют с консервативными участками, что обеспечивает им способность связывать и нейтрализовать большое количество разнообразных штаммов вируса. Однако создать иммуноген способный индуцировать такие антитела пока не удалось. Сейчас все больше исследователей приходит к выводу о том, что вакцина должна состоять из нескольких различных иммуногенов. Собственно, вакцина RV 144, показавшая частичную эффективность в клинических испытаниях, также содержит несколько иммуногенов. Вполне вероятно, что эффективной вакциной окажется комбинация иммуногенов, основанных на разных стратегиях их дизайна.

Целью данной работы является конструирование и изучение свойств ВИЧ-иммуногенов, несущих эпитопы, узнаваемые широконейтрализующими ВИЧ-1 антителами, с использованием в качестве носителей белков TBI, HBcAg и YkuJ.

В данной работе были выбраны два наиболее важных и хорошо охарактеризованных региона ВИЧ-1: регион gp41 мембранно-проксимальной наружной области (MPER, от англ. membrane-proximal external region) которая играет важную роль в процессе слияния вируса с клеткой-мишенью и содержит линейные эпитопы широконейтрализующих антител, таких как 2F5, 4E10 и 10E8; и сайт связывания вируса с клеточным рецептором CD4 гликопротеина gp120 ВИЧ-1 (CD4bs), несущий конформационный эпитоп, узнаваемый bNAbs VRC01. В качестве белков-носителей (скаффолдов) эпитопов, узнаваемых bNAbs, были выбраны три молекулы: белок TBI, HBcAg и белок YkuJ.

Сконструирован иммуноген пТБИ, содержащий линейные эпитопы, узнаваемые bNAbs 10E8, 4E10, 2F5, а также линейный миметик конформационного эпитопа bNAb VRC01. Показано, что, находясь в составе белка пТБИ, линейные эпитопы 4E10, 10E8 и 2F5 сохраняют свои антигенные свойства. Установлено, что имитатор конформационного эпитопа антитела VRC01 при переносе из белка РИИ бактериофага М13 теряет антигенные свойства в составе белка пТБИ. При иммунизации кроликов пТБИ индуцирует образование антител, способных нейтрализовать ряд псевдотипированных штаммов ВИЧ-1.

Также получен химерный белок HBcAg-mimicVRC01, экспонирующий линейный пептид-имитатор конформационного эпитопа, узнаваемого bNAb VRC01. Показано, что химерный белок HBcAg-mimicVRC01 образует частицы подобные нативному коровому белку. Установлено, что сыворотки иммунизированных животных обладают вируснейтрализующей активностью в отношении рекомбинантного ВИЧ-1 92BR025.

Получен искусственный белок MPER-TBI. Установлено, что участки региона MPER ВИЧ-1 в составе химерного белка MPER-TBI, сохраняют альфа спиральную структуру и узнаются МКА к эпитопам входящим в данный регион.

Обосновано и практически реализовано использование белка *B. subtilis* YkuJ в качестве носителя региона MPER ВИЧ-1. Показано что химерный белок YkuJ-MPER обеспечивает в организме лабораторных животных выработку специфичных антител к соответствующему региону ВИЧ-1.

В заключении следует отметить, что все полученные в результате проведенной работы иммуногены обладают специфической антигенностью и иммуногенностью в отношении ВИЧ-1. Полученные данные могут способствовать усовершенствованию методов дизайна искусственных полиэпитопных иммуногенов для индукции ВИЧ-специфического В-клеточного ответа, а также могут быть использованы в стратегиях иммунизаций направленных на индукцию bNAbs.

**ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ ЧАСТИЦ КРОВИ
ЧЕЛОВЕКА — ЭКЗОСОМ И МИКРОВЕЗИКУЛ
НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ A549 ***

THE INFLUENCE OF HUMAN BLOOD PLASMA MEMBRANE-COVERED
VESICLES — EXOSOMES AND MICROPARTICLES
ON LUNG ADENOCARCINOMA CELLS A549

Ю. И. Савиновская, А. В. Савельева, А. А. Нуштаева,
В. В. Морозова, Е. В. Кулигина, В. А. Рихтер, Д. В. Семенов

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

E-mail: yulya_savinovskaya@mail.ru

Y.I. Savinovskaya, A. V. Savelyeva, A. A. Nushtaeva, V. V. Morozova,
E. V. Kuligina, V. A. Richter, D. V. Semenov

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch
of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

Аннотация

Получены препараты мембранных частиц крови здоровых доноров. Методом высокоэффективного секвенирования РНК на платформе Illumina HiSeq 1500 исследовано изменение экспрессии генов в клетках аденокарциномы легких A549 под действием мембранных частиц крови человека.

Abstract

Purified preparations of membrane particles of healthy human blood were obtained. By method of high-throughput RNA sequencing on the Illumina HiSeq 1500 platform was study the alterations in gene expression of human lungs adenocarcinoma A549 cells under the influence of human blood membrane particles.

В настоящее время в крови человека, а также в других биологических жидкостях человека выявлено несколько типов внеклеточных везикул, основными из которых являются экзосомы, микровезикулы и апоптотиче-

© Ю. И. Савиновская, А. В. Савельева, А. А. Нуштаева, В. В. Морозов, Е. В. Кулигина, В. А. Рихтер, Д. В. Семенов, 2018.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-04-01457.

ские тельца. Экзосомы и микровезикулы — мембранные везикулы диаметром 30–100 нм (экзосомы) и 50–2000 нм (микровезикулы), секретируемые в межклеточное пространство жизнеспособными клетками тканей и органов. Внеклеточные везикулы содержат белки, липиды и нуклеиновые кислоты — РНК, ДНК. Мембранные частицы являются не только трофическими факторами, но и активными переносчиками сигналов межклеточной коммуникации и участвуют в регуляции процессов иммунного ответа, секреции белков. Разнообразие структурных компонентов и содержимого циркулирующих мембранных частиц отражает специфичные признаки отдельных клеток, процессов и состояний. Анализ изменений состава и свойств циркулирующих частиц крови является одним из самых активно-развивающихся направлений поиска новых диагностических и прогностических маркеров онкологических, инфекционных, сосудистых и других патологий человека. Предложен целый ряд стратегий использования потенциала мембранных частиц для доставки терапевтических соединений, в том числе и синтетических аналогов микроРНК, в клетки-мишени для разработки новых средств терапии заболеваний человека.

Целью данной работы является анализ влияния мембранных микро- и наночастиц крови здоровых доноров на жизнеспособность и пролиферацию клеток аденокарциномы легких человека линии A549.

Для выделения и очистки мембранных микро- и наночастиц крови человека мы использовали метод последовательного центрифугирования при 1 200g, 16 000g и 3 этапа ультрацентрифугирования при 160 000 g. Было установлено, что препараты мембранных частиц крови здоровых доноров не вызывают апоптотических изменений в клетках A549 и повышают жизнеспособность клеток и клеточную метаболическую активность (МТТ-тест). Методом проточной цитофлуориметрии установлено, что мембранные частицы крови не вызывают апоптотических изменений мембран клеток A549 и не оказывают существенного влияния на пролиферацию.

С использованием метода высокоэффективного секвенирования проведен детальный анализ изменений транскриптома клеток аденокарциномы A549 под действием мембранных частиц крови человека. Для этого проводили выделение polyA РНК из контрольных клеток и клеток, инкубированных в среде с мембранными частицами крови, конструировали кДНК-библиотеки и секвенировали ДНК на станции Illumina HiSeq 1500.

При дифференциальном анализе экспрессии генов в клетках A549 было установлено, что мембранные частицы крови здоровых доноров приводят в течение 6 часов к изменению экспрессии генов из групп сигнальных каскадов цитокинов, а также генов, контролируемых транскрипционным фактором NF- κ B. Инкубация клеток A549 с мембранными частицами

в течение 12 и 24 ч приводит к изменениям экспрессии тех же групп генов, которые выявлены для 6 ч инкубации, а также генов регуляции апоптотического каскада, метаболических процессов, генов белков эндоплазматического ретикулума, мембран эндосом и внеклеточных везикул.

Полученные данные позволяют заключить, что мембранные частицы крови взаимодействуя с клетками A549 на начальном этапе (6 ч), активируют NF-карра-В сигнальные каскады, которые в дальнейшем вызывают масштабные изменения экспрессии генов контроля апоптотических процессов и генов формирования секреторных мембранных везикул.

Результаты могут быть использованы для создания новых средств диагностики и терапии заболеваний с использованием мембранных структур — экзосом и микровезикул крови человека.

ПРОТЕАЗЫ ЭКЗОСОМ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ*

EXOSOMAL PROTEASES IN BREAST CANCER

А. К. Сомов¹, Е. А. Тугутова^{2,3}, К. В. Проскура^{1,4}, С. Н. Тамкович^{1,4},
Н. В. Юнусова^{2,3}, М. Н. Стахеева², П. П. Лактионов^{1,6}

¹ *Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН*

² *НИИ онкологии ТНИМЦ РАН,*

³ *Сибирский государственный медицинский университет,*

⁴ *Новосибирский областной онкологический диспансер,*

⁵ *Новосибирский государственный университет,*

⁶ *Новосибирский научно-исследовательский институт патологии
кровообращения имени академика Е. Н. Мешалкина*

Аннотация

Показано, что экзосомы опухолевого происхождения участвуют в формировании приметастатической ниши, увеличивают инвазивный потенциал клеток, усиливают ангиогенез и экспрессию клетками проангиогенных факторов. Целью исследования было оценка уровня тетраспанин-ассоциированных (ADAM-10) и тетраспанин-неассоциированных (20S протеасом) протеаз в экзосомах в крови при развитии рака молочной железы. Экзосомы были выделены и охарактеризованы в соответствии с рекомендациями Сообщества Внеклеточных Везикул (Extracellular Vesicle Society). Уровень экспрессии 20S протеасом и ADAM-10 в экзосомах определяли методами вестерн-блот анализа и проточной цитофлуориметрии, соответственно. Уровень экспрессии ADAM-10 в субпопуляции CD9-позитивных экзосом и уровень 20S протеасом достоверно повышены в экзосомах из культуральной среды MCF-7 и плазме крови онкологических больных по сравнению с экзосомами из культуральной среды HUVES и экзосомами из плазмы крови здоровых женщин. Полученные данные подтверждают роль экзосомальных протеаз в прогрессировании опухоли.

Abstract

As is known, exosomes play an important role in promoting progression of cancers by increasing its invasive potential. The aim of this study was to evaluate the levels of tetraspanine-associated (ADAM-10) and tetraspanine-nonassociated proteases (20S proteasomes) in exosomes in the blood in the breast cancer development. Exosomes were

© А. К. Сомов, Е. А. Тугутова, К. В. Проскура, С. Н. Тамкович, Н. В. Юнусова, М. Н. Стахеева, П. П. Лактионов, 2018.

* Исследование выполнено при поддержке РФФИ и Правительства Новосибирской области в рамках научного проекта №18-415-540012.

isolated and characterized in accordance with the recommendations of the Extracellular Vesicles Society. The expression level of 20S proteasomes and ADAM-10 in exosomes determined methods of Western blot analysis and flow cytometry, respectively. The level of expression of ADAM-10 in the subpopulation of CD9-positive exosomes and the 20S level of proteasomes are significantly increased in exosomes from MCF-7 culture medium and blood plasma of cancer patients compared to exosomes from HUVEC medium and blood plasma exosomes of healthy women. Obtained data confirm role of exosomal proteases in tumor progression.

Актуальность

Несмотря на активное распространение маммографии, доля первично выявленных больных раком молочной железы (РМЖ) на поздней стадии заболевания остается высокой (1). Для повышения эффективности ранней диагностики онкологических заболеваний и выявления новых терапевтических стратегий, актуальной задачей является изучение механизмов метастазирования опухолей.

Экзосомы секретируемые раковыми клетками влияют как на развитие первичной опухоли, так и на развитие удалённых метастазов путем горизонтального переноса РНК и белков (2, 3). Известно, что в состав экзосом входят протеазы. Ранее ADAM-10 и 20S-протеасомы были обнаружены в составе экзосом из мезенхимальных стволовых клеток (4) и эндотелиальных клетках (5). Однако уровень этих ферментов в экзосомах биологических жидкостей онкологических больных остается неясным.

Материалы и методы

В исследование были включены препараты экзосом из культуральной среды MCF-7 и плазмы крови здоровых женщин (n=30), больных мастопатией (n=28) и больных РМЖ (n=32) путем ультрафильтрации с последующим ультрацентрифугированием (6). Экзосомальную природу везикул подтверждали проточной цитофлуориметрией на латексных частицах с использованием антител против CD9, CD24, CD63 и CD81 (BD Biosciences). Для количественного белкового анализа использовали коммерческий набор NanoOrange Protein Quantitation kit (Invitrogen). Уровень экспрессии ADAM-10 и 20S протеасом в экзосомах определяли методами проточной цитофлуориметрии и вестерн-блот анализа соответственно.

Результаты

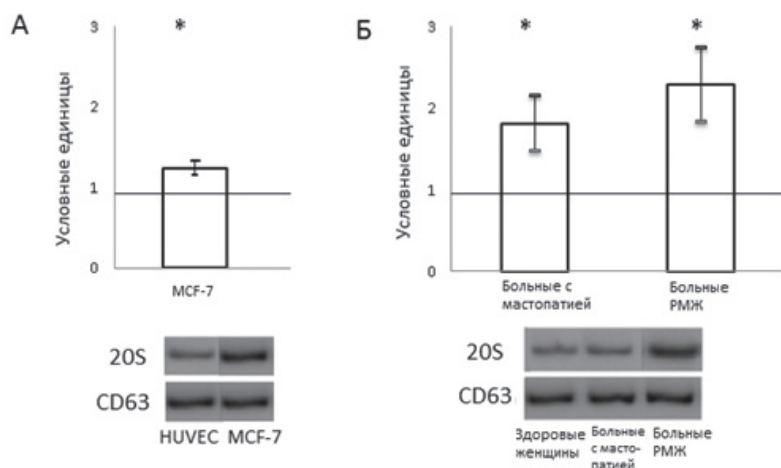
Субпопуляционная представленность экзосом в образцах из среды культуры карциномы молочной железы MCF-7, плазмы крови здоровых женщин и плазмы крови больных РМЖ оказалась сходной: CD24/CD9 > CD9/CD81 > CD24/CD63 > CD9/CD63. Медианы концентраций экзосомальных

белков в плазме крови у здоровых доноров, больных мастопатией и больных РМЖ составили 14.5, 12.2, 14.2 мкг/мл соответственно. Методом проточной цитофлуориметрии в препаратах экзосом плазмы больных РМЖ и экзосомах культуральной среды клеток MCF-7 показано достоверное повышение уровня экспрессии поверхностной формы ADAM-10 в CD-9 положительной субпопуляции экзосом по сравнению с образцами экзосом из плазмы здоровых доноров (в 1,8 и 1,9 раз, соответственно) (см. таблицу).

**Оценка представленности CD9, CD24 и CD81
на поверхности ADAM-10 позитивных экзосом
из культуральной среды MCF-7 и плазмы крови
здоровых доноров и онкологических больных**

Источник экзосом		CD9+	CD24+	CD81+
Здоровые женщины	Плазма	844±99	884±124	621±84
Больные мастопатией	Плазма	—	1031±155	—
Больные РМЖ	Плазма	1531±162*	926±94	696±68
MCF-7	Среда	1607±128*	887±67	597±48

Примечание. * — значимые отклонения по сравнению с здоровыми донорами. Представлен уровень интенсивности медианы флуорисценции (MFI) ± SEM.



Уровень 20S протеасом в составе экзосом из культуральной среды клеток MCF-7 (А) и из плазмы пациентов с РМЖ и мастопатией по сравнению со здоровыми женщинами (Б)

С помощью вестерн-блот анализа было показано, что уровень экспрессии 20S протеасом достоверно повышен в экзосомах из культуральной среды MCF-7 и в экзосомах из плазмы крови больных мастопатией и РМЖ ($1,25 \pm 0,08$, $1,81 \pm 0,34$ и $2,28 \pm 0,46$ усл ед, соответственно) по сравнению с препаратами экзосом из культуры клеток HUVEC, а так же плазмы здоровых доноров.

Выводы

Субпопуляционный состав экзосом из культуральной среды и плазмы крови здоровых женщин и больных с мастопатией и больных РМЖ сходен, однако содержание в них тетраспанин-ассоциированных и тетраспанин-неассоциированных протеаз различно. Выявленное перераспределение экзосомальных протеаз в субпопуляциях экзосом в норме и при заболеваниях молочной железы может указывать на различные механизмы сортировки биологически активных молекул в везикулы, большинство из которых неясны. Ожидается, что понимание роли различных субпопуляций экзосом в опухолевом микроокружении и формировании метастатических ниш приведет к развитию опухолеспецифической терапии.

Литература

1. Witten M, Parker CC (2018). Screening Mammography: Recommendations and Controversies. *Surg Clin North Am*, 98(4), 667–75.
2. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, et al (2016). Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS One*, 11, e0157566.
3. Li W, Li C, Zhou T, et al (2017). Role of exosomal proteins in cancer diagnosis. *Mol Cancer*, 16(1), 145.
4. Lai RC, Tan SS, Teh BJ, et al (2012). Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *J Proteomics*, 12, 971907.
5. Dieudé M, Bell C, Turgeon J, et al (2015). The 20S proteasome core, active within apoptotic exosome-like vesicles, induces autoantibody production and accelerates rejection. *Sci Transl Med*, 7(318), 318ra200.
6. Grigor'eva AE, Dyrkheeva NS, Bryzgunova OE, et al (2017). Contamination of exosome preparations, isolated from biological fluids. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, 11, 265.

**ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ
КОНСЕРВАТИВНЫЕ ФРАГМЕНТЫ СТЕБЛЯ
ГЕМАГГЛЮТИНИНА И БЕЛОК M2 ВИРУСА ГРИППА**

**STUDY THE SPECIFIC ACTIVITY OF DNA VACCINE CONSTRUCTS
ENCODING THE CONSERVATIVE FRAGMENTS OF HEMAGGLUTININ
AND M2 PROTEIN FROM INFLUENZA VIRUS**

Е. В. Старостина, С. А. Федотова, С. Г. Дудко, Д. В. Антонец,
О. Н. Каплина, Л. И. Карпенко, С. И. Бажан

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия

E. V. Starostina, S. A. Fedotova, S. G. Dudko, D. V. Antonets,
O. N. Kaplina, L. I. Karpenko, S. I. Bazhan

FBRI SRC VB «Vector», Rosпотребнадзор, Russia

Аннотация

В данной работе представлены результаты исследования Т-клеточного иммунного ответа у мышей, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями спроектированных с использованием консервативных фрагментов стебля гемагглютинаина и белка M2 вируса гриппа. Показано, что ДНК-вакцинные конструкции при совместной иммунизации животных, обладают способностью индуцировать Т-клеточный иммунный ответ, специфичный в отношении вируса гриппа.

Abstract

This paper presents the results of the study of T-cell immune response in mice immunized with DNA vaccines, containing conservative fragments of hemagglutinin and M2 protein from influenza virus. It has been shown that DNA vaccine constructs encoding artificial influenza virus antigens induced specific T-cell immune response to the influenza virus.

Грипп — одно из самых распространенных заболеваний верхних дыхательных путей, возбудитель которого — вирус гриппа. Ежегодно во время эпидемий от данного заболевания погибают от 250 до 500 тыс. человек. На данный момент для профилактики гриппа используется следующий подход: на основе эпидемически актуальных штаммов вируса гриппа создаются

вакцины, которые могут содержать аттенуированный или же инактивированный возбудитель заболевания. Проблемой этого метода является высокая изменчивость вируса гриппа, вследствие чего возникают трудности в предсказании актуальных штаммов. Создание универсальной гриппозной вакцины – сложная научная проблема, требующая новых решений. Одним из подходов, нацеленных на решение этой проблемы, является создание вакцин, кодирующих консервативные антигены вируса гриппа. Во ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» были созданы кандидатные универсальные ДНК-вакцины, кодирующие консервативные антигены. Два из них сконструированные, AgH1 и AgH3, спроектированы на основе консервативных фрагментов стебля гемагглютинаина разных субтипов вируса гриппа (H1N1 и H3N2, соответственно), а третий иммуноген AgM2 — на основе консервативного вирусного белка M2.

Цель данной работы — оценка Т-клеточного иммунного ответа у животных, иммунизированных ДНК-вакцинными конструкциями, кодирующими спроектированные антигены вируса гриппа. Для иммунизации использовались мыши BALB/c, самки весом 16–18 г. Все животные были разбиты на три группы: (1) мыши, иммунизированные смесью трех ДНК-вакцин (AgH1, AgH3 и AgM2); (2) мыши, иммунизированные плазмидным вектором pcDNA 3.1, не несущим целевых генов (отрицательный контроль) и (3) мыши, иммунизированные вирусом гриппа (штамм A/California/4/2009 (H1N1pdm09) — положительный контроль). Иммунизация проводилась внутримышечно трёхкратно с интервалом две недели (доза 100 мкг ДНК на мышь). Для оценки иммунного ответа использовали два метода: внутриклеточное окрашивание цитокинов и IFN- γ ELISpot, которые позволяют оценивать количество CD4+ и cD8+Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ . От иммунизированных мышей забирали селезёнки, из которых выделяли спленоциты и стимулировали их синтетическими пептидами, соответствующими эпитопам, входящих в состав спроектированных иммуногенов. Число клеток, секретирующих IFN- γ на 10^6 клеток селезенки, регистрировали после того, как клетки селезенки были проинкубированы в присутствии пептидов или же в отсутствие пептидов (спонтанный выброс цитокинов). Достоверным результатом считали соотношение количества цитокинов после стимуляции пептидами к количеству цитокинов, не стимулированных пептидами, равное и более 2. Данные полученные с помощью метода ELISpot показали, что в группе, иммунизированной суммарными ДНК-вакцинами, наблюдался достоверно значимый иммунный ответ. Измерение процента клеток, синтезирующих цитокины IFN- γ и IL-2, проводилось с использованием проточного цитофлуориметра FACSCalibur.

Полученные результаты показали, что спроектированные вакцинные конструкции индуцируют ответ CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих как IFN- γ , так и IL-2. Количество Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , измеренное с помощью метода ELISpot коррелирует с результатами измерений процента цитотоксических Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ , полученными с помощью метода внутриклеточного окрашивания цитокинов.

Таким образом, полученные результаты показывают, что ДНК-вакцинные конструкции, кодирующие искусственные антигены вируса гриппа, обладают способностью индуцировать Т-клеточный иммунный ответ, специфичный в отношении вируса гриппа.

ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНАХ LEP И MC4R У ПАЦИЕНТОВ С МОРБИДНЫМ ОЖИРЕНИЕМ*

SEARCH OF MUTATIONS IN THE GENES LEP AND MC4R IN PATIENTS WITH MORBID OBESITY

К. В. Субботина

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

K. V. Subbotina

*Institute of chemical biology and fundamental medicine
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
Novosibirsk State University*

Аннотация

Ожирение является глобальной проблемой. Официальная статистика ВОЗ насчитывает около 1,9 млрд. человек в мире с избыточным весом. Нами было проведено исследование по поиску мутаций в генах, ответственных за появление избыточной массы тела (LEP, LEPR, POMC, PCSK1 и MC4R), у пациентов, страдающих ожирением в Новосибирской области, (НСО) с помощью современных молекулярно-генетических методов.

Abstract

Obesity is a global problem. According to official statistics about 1,9 billion people in the world are overweight. We conducted a study to search for mutations in genes responsible for the emergence of overweight (LEP, LEPR, POMC, PCSK1 and MC4R) in patients suffering from obesity in the Novosibirsk region with the help of modern molecular-genetic methods.

Введение

Ожирением называют хроническое заболевание, которое характеризуется увеличением массы тела и связано с нарушением обмена веществ. Генетика играет фундаментальную роль в развитии ожирения. Гены лептин-меланокортиновой системы (LEP, LEPR, POMC, PCSK1 и MC4R), участвующей в контроле аппетита, являются одним из ключевых звеньев регуляции

обмена веществ. Целью нашей работы является анализ данных о наличии мутаций в вышеуказанных генах, а также дальнейший поиск мутаций в генах LEP и MC4R у жителей НСО с индексом массы тела (ИМТ) выше нормы (т. е. выше 18.5–25).

Материалы и методы

В источнике NCBI были найдены и изучены более 35 научных публикаций о ранее обнаруженных мутациях в таких генах, как LEP, MC4R, POMC, PSCK1, LEPR.

С помощью ПЦР и дальнейшего секвенирования были исследованы ДНК 50 людей. Среднее значение ИМТ пациентов равнялось 48. Были отобраны пациенты, имеющие высокую степень ожирения с ИМТ в пределах 45–60. Среди пациентов соотношение полов было следующим: 38 женщин и 12 мужчин. Также нами было проведено сравнение полученных данных с контрольными ДНК 50 людей, которые не страдают ожирением.

Результаты

В ходе проведённого анализа были собраны данные о количестве найденных мутаций на основании изученных нами статей (см. таблицу).

Число мутаций в генах ожирения

Ген	Мутации, кол-во	Число пациентов	Контрольное число пациентов	Страна	Год	Автор статьи
LEP	1	35	100	Китай	2014	Yue Zhao
	1	475	—*	Пакистан	2016	Shabana
MC4R	4	77	177	Италия	2016	B. Paolin
	3	268	—*	Словакия	2015	Stanikova
	2	77	—*	Испания	2012	S.Granell
POMC	1	250	225	Пакистан	2015	Shabana
	1	126	75	Франция	2014	Philippe J
PSCK1	1	105	55	Франция	2015	Philippe J
LEPR	3	535	—*	Франция	2015	H. Huvenne

Примечание. * В некоторых статьях отсутствовала информация о контролях.

Как видно из таблицы, число найденных мутаций в генах слишком мало (до 5.19 % от числа пациентов, которые участвовали в исследованиях). Гены LEP и MC4R были выбраны нами для работы из-за частой встречаемости в них мутаций по сравнению с генами POMC, PSCK1, LEPR.

В результате практической части работы нами не было обнаружено мутаций в генах LEP и MC4R. Результат может быть связан с тем, что либо у данных людей к развитию ожирения привели мутации в других генах (LEPR, POMC, PCSK1), либо основными причинами являются факторы окружающей среды (такие как отсутствие физических нагрузок и несбалансированное высококалорийное питание).

В процессе анализа было обнаружено, что некоторые гены отвечают и за другие заболевания (мутация в гене PCSK1 приводит не только к ожирению, но и к значительной абсорбционной дисфункции тонкой кишки, а мутации в генах LEP и LEPR могут привести к плоскоклеточному раку пищевода). Поэтому, мы также планируем провести исследование по поиску мутаций, ответственных за другие, отличные от ожирения, заболевания.

**ГИБЕЛЬ КЛЕТОК В ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ
И СЕТЧАТКЕ КРЫС OXYS НА СТАДИИ,
ПРЕДШЕСТВУЮЩЕЙ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ***

**CELL DEATH IN PREFRONTAL CORTEX AND RETINA
OF OXYS RATS IN THE PRECEDING STAGE
OF NEURODEGENERATION**

Г. К. Суворов, О. С. Кожевникова, Д. В. Телегина

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

G. K. Suvorov, O. S. Kozhevnikova, D. V. Telegina

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Аннотация

В работе исследованы общие молекулярные механизмы апоптоза и аутофагии на ранней доклинической стадии развития болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД) — неизлечимых нейродегенеративных заболеваний, сходство патогенеза которых в последнее время активно обсуждается. Исследование проведено на линии преждевременно стареющих крыс OXYS, у которых развиваются признаки болезни Альцгеймера и ретинопатия, аналогичная ВМД у людей. Показано, что на доклинической стадии болезни (возраст 20 дней) проявлениям признаков БА и ВМД у крыс OXYS предшествует усиление апоптоза.

Abstract

The research studied the common molecular mechanisms of apoptosis and autophagy during early preclinical stages of Alzheimer disease and age-related macular degeneration (AMD) — incurable neurodegenerative diseases, whose similarity of pathogenesis currently being actively discussed. In this study, we used a senescence-accelerated OXYS rat which develop the clinical signs of Alzheimer disease and AMD-like retinopathy. We have found that OXYS rats characterized by increasing of apoptosis at preclinical stages of the diseases (age of 20 days).

Возраст является общим фактором риска для болезни Альцгеймера (БА) и возрастной макулярной дегенерации (ВМД), заболеваемость которыми растет по мере увеличения продолжительности жизни населения развитых стран. Эффективных способов профилактики и лечения БА — самой рас-

© Г. К. Суворов, О. С. Кожевникова, Д. В. Телегина, 2018.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 18-315-00216.

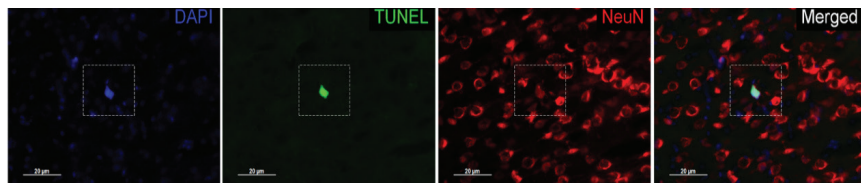
пространенной прогрессирующей сенильной деменции, и ВМД, которая становится основной причиной потери зрения людьми старше 60 лет, нет. Популяционные исследования выявили высокую частоту когнитивных нарушений у больных ВМД, и, напротив, патологические изменения глазного дна у большинства больных БА (Nolan et al., 2014; Keenan et al., 2014; Frost et al., 2016). Перекрываются факторы риска (курение, гипертония, гиперхолестеринемия, атеросклероз, ожирение, неправильное питание) и механизмы патогенеза БА и ВМД, среди которых усиленный окислительный стресс, воспаление, нарушения протеосомной, лизосомальных и митохондриальных функций, нарушение агрегации белков и накопление амилоида бета в аномальных внеклеточных отложениях — сенильных бляшках в мозге у пациентов с БА, и в друзах больных ВМД приводят к усиленной гибели нейронов (Sivak, 2013). Тем не менее, молекулярные механизмы гибели клеток как при БА, так и при ВМД, особенно на ранних, доклинических этапах развития болезней, остаются неясными, что затрудняет поиск эффективной лекарственной терапии. В последнее время накапливаются данные о том, что при развитии БА и ВМД решающее значение может иметь нарушение процессов апоптоза и аутофагии, приводящих к нарушению процесса деградации нефункционирующих органелл и преждевременной гибели нейронов.

В работе использована линия крыс OXYS (ИЦиГ СО РАН) — уникальная модель преждевременного старения, проявлением которого становится развитие аналогичной ВМД ретинопатии и ускоренного старения мозга с характерными для болезни Альцгеймера признаками (Stefanova et al., 2014; Kolosova et al., 2014). Нейродегенеративные процессы в сетчатке и мозге развиваются у крыс OXYS параллельно, сопряжены с усиленным накоплением бета амилоида, что предполагает общие механизмы их развития. Цель настоящего исследования — выявление общих молекулярных механизмов гибели клеток на этапе предшествующему развитию нейродегенеративных изменений в мозге и сетчатке крыс OXYS. В работе использовали крыс Вистар (контроль) и OXYS в возрасте 20 дней — доклинический период развития признаков БА и ретинопатии.

Исследование активности процессов апоптоза в префронтальной коре и сетчатке крыс Вистар и OXYS проводили с помощью TUNEL окрашивания, используя DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega) согласно предложенному протоколу. В префронтальной коре крыс оценивали общее количество апоптотных клеток (TUNEL+ клетки) и количество апоптотных нейронов (колокализованные TUNEL+ и NeuN+ клетки) в поле зрения (рис. 1).

Принципиально важно, что в возрасте 20 дней — период окончания созревания мозга, как в сетчатке, так и префронтальной коре крыс OXYS количество TUNEL+ клеток на 30 % выше, чем у крыс Вистар. При этом

в префронтальной коре количество апоптозных нейронов у крыс OXYS также достоверно выше, чем у крыс Вистар (F1, 22=5,92, $p<0,05$).



Пример окрашивания срезов мозга крыс OXYS методом TUNEL (зеленый), и его колокализация с маркером зрелых нейронов NeuN (красный), ядра окрашены DAPI (синий). Бар 20 мкм

Оценка изменений с возрастом содержания белков, участвующих в регуляции аутофагии (Atg7, связанной формы Atg12, LC3 A/B) в префронтальной коре и сетчатке 20-дневных крыс OXYS и Вистар была выполнена методом Вестерн-блот анализа и иммуногистохимии. Как показал ANOVA-анализ, в префронтальной коре уровень Atg7 и Atg12 не зависел от генотипа. Сравнение групповых средних выявило достоверные межлинейные различия в префронтальной коре только в базальном уровне LC3 A/B — его снижение у крыс OXYS ($p<0.01$), свидетельствующее об снижении у них уровня аутофагии. Иммуногистохимическое исследование показало, что в префронтальной коре крыс обеих линий в возрасте 20 дней сигнал белка LC3 A/B детектируется в основном в глиальных клетках, были выявлялись только отдельные нейроны, содержащие LC3, не более 5 % от общего числа нейронов.

Иммуноокрашивание антителами к белку-маркеру аутофагосом LC3A/B криосрезов сетчатки показало слабое диффузное окрашивание во всех слоях сетчатки 20-дневных крыс обеих линий. Анализ результатов иммуногистохимического окрашивания криосрезов сетчатки показал, что сигнал Atg7 детектируется преимущественно во внутреннем сетчатом и ганглионарном слоях сетчатки крыс обеих линий. Сигналы Atg12 локализовались преимущественно в слое фоторецепторных нейронов и на уровне наружных сегментов фоторецепторов. В других слоях интенсивность свечения Atg12 была слабее. Межлинейных различий по интенсивности сигналов Atg7 и Atg12 в возрасте 20 дней не обнаружено. Вестерн-блот анализ также не выявил достоверных межлинейных различий в уровне белков Atg7 и Atg12 в сетчатке крыс Вистар и OXYS ($p<0.05$).

Таким образом, проявлениям признаков БА и ВМД у крыс OXYS предшествует усиление апоптоза. К возрасту 20 дней завершается период постнатального развития головного мозга крысы, связанный с коррекцией ошибок

и необходимым для оптимизации нейронных сетей устранением «переходных» клеточных популяций путем апоптоза. Возможно, повышенная по сравнению с крысами Вистар активность процессов апоптоза у крыс OXYS связана с нарушением созревания мозга и отставанием формирования синаптической пластичности в период раннего постнатального онтогенеза.

Литература

1. Frost S. et al. Alzheimer's disease and the early signs of age-related macular degeneration // *Current Alzheimer Research*. — 2016. — Т. 13. — №. 11. — С. 1259–1266.
2. Nolan J. M. et al. Macular pigment, visual function, and macular disease among subjects with Alzheimer's disease: an exploratory study // *Journal of Alzheimer's Disease*. — 2014. — Т. 42. — №. 4. — С. 1191–1202.
3. Keenan T. D. L., Goldacre R., Goldacre M. J. Associations between age-related macular degeneration, Alzheimer disease, and dementia: record linkage study of hospital admissions // *JAMA ophthalmology*. — 2014. — Т. 132. — №. 1. — С. 63–68.
4. Sivak J. M. The aging eye: common degenerative mechanisms between the Alzheimer's brain and retinal disease // *Investigative ophthalmology & visual science*. — 2013. — Т. 54. — №. 1. — С. 871–880.
5. Stefanova N. et al. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease // *Cell cycle*. — 2014. — Т. 13. — №. 6. — С. 898–909.
6. Kolosova N. G. et al. Senescence-accelerated OXYS rats: A genetic model of premature aging and age-related diseases // *Advances in Gerontology*. — 2014. — Т. 4. — №. 4. — С. 294–298.

**РОЛЬ БЕЛКОВ AP-1 КОМПЛЕКСА
В ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ
ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ***

**THE ROLE OF AP-1 PROTEINS IN THE GLUCOCORTICOID
REGULATION OF TYROSINE HYDROXYLASE EXPRESSION**

Е. В. Сухарева^{1,2}, Д. А. Ланшаков¹, Т. С. Калинина^{1,2},
В. В. Булыгина¹, Н. Н. Дыгало^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук» (ФИЦ ИЦиГ СО РАН)

² Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Новосибирский
национальный исследовательский государственный университет»

E. V. Sukhareva^{1,2}, D. A. Lanshakov¹, T. S. Kalinina^{1,2},
V. V. Bulygina¹, N. N. Dygalo^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

E-mail: evsukhareva@mail.ru

Аннотация

Индукция глюкокортикоидами экспрессии гена тирозингидроксилазы мозга, ключевого фермента синтеза катехоламинов, определяется взаимодействием рецептора гормона с транскрипционным фактором AP-1 на консенсусном участке промотора гена фермента. Активация неканонического механизма действия глюкокортикоидов в раннем онтогенезе обуславливает чувствительность к гормону животных разного возраста.

Abstract

Glucocorticoid induction of the brain tyrosine hydroxylase gene expression, a key enzyme for the synthesis of catecholamines, is determined by the interaction of the hormone receptor with the transcription factor AP-1 in the consensus region of the enzyme gene promoter. Activation of the non-canonical mechanism of glucocorticoids in early ontogenesis defines sensitivity to the hormone of different ages animals.

© Е. В. Сухарева, Д. А. Ланшаков, Т. С. Калинина, В. В. Булыгина, Н. Н. Дыгало, 2018.

* Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00118.

Глюкокортикоиды — гормоны стресса осуществляют свое действие через изменение экспрессии гормон-зависимых генов. Механизмы действия гормонов осуществляются через собственные рецепторы (GR), которые являясь транскрипционными факторами, взаимодействуют как со специфическими гормон-отвечающими элементами (GRE) генома (канонический механизм), так и с другими транскрипционными факторами (неканонический механизм). Одним из таких факторов является AP-1 комплекс, который образуется взаимодействием гомодимеров белков Jun или гетеродимеров Jun/Fos с гептамерной консенсусной последовательностью промоторов многих генов. Неканонический механизм расширяет список генов, регулируемых глюкокортикоидами, но не имеющих в своих промоторах гормон-зависимых элементов. Одним из таких генов может быть ген ключевого фермента синтеза катехоламинов — тирозингидроксилаза (ТГ), глюкокортикоидная индукция экспрессии которого зависит от возраста. Промотор гена ТГ содержит два AP-1 элемента, один из которых вовлечен в гормональную индукцию гена в культуре феохромоцитомы. Известно, что при взаимодействии GR с гомодимером Jun/Jun AP-1 комплекса глюкокортикоиды активируют, а при взаимодействии с гетеродимером Jun/Fos, напротив, подавляют транскрипцию генов. Следовательно, направление изменения транскрипции гена ТГ может определяться соотношением экспрессии белков Jun и Fos в разные сроки онтогенеза.

Для выявления роли белков транскрипционного комплекса AP-1 в регуляции глюкокортикоидами экспрессии ключевого фермента синтеза катехоламинов — тирозингидроксилазы (ТГ) в головном мозге крыс в раннем онтогенезе определяли уровни мРНК *c-jun*, *junB*, *junD*, *c-fos*, *fosB* (ОТ-ПЦР в реальном времени) и белков JunB, c-Fos (иммуногистохимический анализ) в стволе мозга 3- и 8-дневных крысят. Соотношение уровней мРНК *c-jun*, *junB*, *junD* к *c-fos* или *fosB* и белков JunB/c-Fos значительно выше в стволе мозга 3-дневных животных по сравнению с 8-дневными, что способствует объяснению достоверного повышения регуляции уровней мРНК и белка ТГ через 4–6 часов после воздействия дексаметазона (0,2 мг/кг) у 3-дневных крысят без каких-либо эффектов у 8-дневных. Кроме того, методом иммунопреципитации хроматина (CHIP-qPCR) было показано значительно большее связывание белков JunB с дистальным AP-1-элементом промотора ТГ через 6 часов после гормонального воздействия в стволе головного мозга в период выявленной глюкокортикоидной индукции гена ТГ на 3-й день жизни, чем в период нечувствительности экспрессии гена фермента к гормону у 8-дневных животных. Таким образом, зависимость от возраста индукция глюкокортикоидами ТГ в перинатальном головном мозге ассоциирована

с преобладанием количества транскриптов и белков Jun над Fos, а также большей степенью взаимодействия белка JunB с AP-1 элементом промотора гена ТГ, являющимися компонентами неканонического механизма действия гормона, активирующего экспрессию генов.

**ПРИЛОЖЕНИЕ МЕТОДА MALDI-TOF
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ
ОЦЕНКИ МАРКЕРОВ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ
И СЕПСИСА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА**

AN APPLICATION OF MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY
FOR QUANTITATIVE EVALUATION OF MARKERS
OF SYSTEMIC INFLAMMATION AND SEPSIS IN HUMAN SERUM

A. С. Тараскин, А. В. Протасов, С. А. Клотченко, О. А. Миргородская

*ФГБУ «НИИ группа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России,
Санкт-Петербург, Россия*

A. S. Taraskin, A. V. Protasov, S. A. Klotchenko, O. A. Mirgorodskaya

*Smorodintsev Research Institute of Influenza,
Ministry of Health of the Russian Federation*

E-mail: taraskin_07@bk.ru

Аннотация

Основной целью данного исследования являлась разработка и верификация метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для одновременной количественной оценки сразу нескольких маркеров воспаления: альфа-2-макроглобулин, альфа-2-HS-гликопротеин (фетуин А), сывороточный альбумин, сывороточный амилоид А и фибринопептид А, в сыворотках крови человека для диагностики системной воспалительной реакции и сепсиса с применением изотопно-меченого внутреннего стандарта. На выборке из 27 образцов, полученных от пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей в СПб ГБУЗ «Городская больница № 14», было показано, что в группе больных с клиническим диагнозом «сепсис» наблюдалось значительное отклонение от референсных значений уровней всех измеренных маркеров в сыворотке крови.

Abstract

The aim of this work was to develop a method for simultaneous quantification of several inflammatory markers such as alpha-2-macroglobulin, alpha-2-HS-glycoprotein (fetuin A), serum albumin, serum amyloid A and fibrinopeptide A in human blood serum by MALDI mass spectrometry for the diagnosis of systemic inflammatory response syndrome and sepsis using isotopomers, peptides that contain stable isotopes of oxygen. In a sample of 27 serum specimens, obtained from patients of the St. Petersburg City Clinical Hospital

№ 14 with pyo-inflammatory soft tissue diseases, there was a significant deviation from the reference values levels of all measured markers in serum of patients with a clinical diagnosis of «sepsis».

Системная воспалительная реакция организма (СВР) — это типовой патологический процесс, развивающийся при системном повреждении, как правило, протекающий при участии медиаторов воспаления с вовлечением практически всех систем организма. Изначально воспалительная реакция развивается преимущественно местно — в очаге воспаления. Развитие местного патофизиологического процесса осуществляется путём поддержания баланса между противо- и провоспалительными медиаторами воспаления. При несостоятельности противовоспалительных факторов, в кровотоке происходит генерализация факторов повреждения, способных индуцировать «воспалительный» клеточный стресс на системном уровне. Основным иницирующим механизмом для развития системной воспалительной реакции является поступление в системный кровоток из очага воспаления отдельных цитокинов и некоторых других медиаторов [1].

Согласно современным представлениям, сепсис — это патологический процесс, в основе которого лежит реакция организма в виде генерализованного воспаления на инфекцию различной природы в сочетании с остро возникшими признаками органной дисфункции и/или доказательствами микробной диссеминации. Сепсис описывается комплексным клиническим синдромом системной воспалительной реакции (ССВР) организма при инфицировании бактериями, грибами, вирусами и паразитами [2]. Чаще всего сепсис вызывают бактерии *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella spp.* и *N. meningitidis*. Сепсис также может являться смертельным следствием инфицирования вирусами сезонного, птичьего и свиного гриппа, вирусами лихорадки Денге и желтой лихорадки, коронавирусами, вирусами Эбола [3]. Без своевременного лечения сепсис может привести к развитию полиорганной недостаточности и смерти [4]. Ключевым фактором в положительном исходе заболевания является своевременная и точная диагностика. Однако в настоящее время число используемых в клинической практике молекулярных маркеров для диагностики сепсиса крайне мало и ограничивается, в основном, прокальцитонином (procalcitonin, PCT), С-реактивным белком (C-reactive protein, CRP) и эндотоксином, а также относительно новым маркером пресепсином.

В настоящий момент существует порядка двухсот биомаркеров, потенциально представляющих интерес при диагностике системного воспаления и сепсиса[5]. Однако ни один из предлагаемых в качестве маркера воспалений белковый фактор не обладает необходимой надёжностью, чтобы исполь-

зывать его в качестве единого критерия молекулярной диагностики. Именно поэтому основной задачей предлагаемого исследования являлась разработка диагностической тест-системы, позволяющей одновременно и быстро проводить детекцию в биологических жидкостях (в сыворотке крови) нескольких биомаркеров с использованием малых объемов реагентов и образцов.

Возможность одновременно детектировать несколько факторов воспаления позволит получить более полную картину состояния конкретного больного, а также обеспечит дифференциальный мониторинг патологии. Такой подход позволит не только детерминировать воспаления инфекционного и неинфекционного генеза, но и проводить пациент-ориентированную диагностику и лечение, в том числе основанное на использовании рациональных принципов антибиотикотерапии [6, 7].

В качестве измеряемых маркеров в данном исследовании выступали: альфа-2-макроглобулин, альфа-2-HS-гликопротеин (фетуин А), сывороточный альбумин, сывороточный амилоид А и фибринопептид А.

Альфа-2-макроглобулин (a2-MG) действует как антипротеаза и способен инактивировать огромное количество протеиназ. Действует как ингибитор фибринолиза, ингибируя плазмин и калликреин. Действует как ингибитор коагуляции, ингибируя тромбин [8].

Альфа-2-HS-гликопротеин (Фетуин А) участвует в нескольких функциях, таких как эндоцитоз, развитие мозга и образование костной ткани. Фетуины — это белки-носители, такие как альбумин. Фетуин-А образует растворимые комплексы с кальцием и фосфатом и, таким образом, является носителем нерастворимого в других условиях фосфата кальция [9].

Альбумин является основным белком плазмы крови человека. Он связывает воду, катионы (такие как Ca^{2+} , Na^{+} и K^{+}), жирные кислоты, гормоны, билирубин, tiroксин и фармацевтические препараты (включая барбитураты). Основная функция заключается в регулировании онкотического давления крови [10].

Сывороточный амилоид А (Serum amyloid A, SAA) является быстро и сильно реагирующим маркером острой фазы. Подобно С-реактивному белку (CRP), уровень SAA увеличивается в течение нескольких часов после воспалительного стимула, и увеличение может быть большим, чем у CRP. Относительно простые воспалительные стимулы могут приводить к ответу SAA [11].

Фибринопептид А (ФПА) — пептид, отщепляемый тромбином от альфа-цепи фибриногена, при превращении фибриногена в фибрин. Количество ФПА указывает на активность свертывающей системы крови [12].

Основной целью данного исследования являлась разработка и верификация метода MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization — Time

Of Flight) масс-спектрометрии для одновременной количественной оценки таких маркеров воспаления, как альфа-2-макроглобулин, альфа-2-HS-гликопротеин (фетуин А), сывороточный альбумин, сывороточный амилоид А и фибринопептид А, в сыворотках крови человека для диагностики системной воспалительной реакции и сепсиса с применением изотопно-меченого внутреннего стандарта согласно методике [13].

Для верификации метода в образцах контрольной группы пациентов были измерены уровни альфа-2-макроглобулина спектрофотометрически [14] и с помощью разработанной методики. Предварительная апробация метода на выборке из 27 образцов от пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями мягких тканей, полученных в СПб ГБУЗ «Городская больница № 14», показала, что в группе больных с клиническим диагнозом «сепсис» наблюдалось отклонение от референсных значений уровней всех измеренных маркеров в сыворотке крови.

В процессе выполнения работы была получена и применена новая потенциальная методика диагностики СВР и сепсиса на основе количественной масс-спектрометрии с применением изотопно-меченых стандартов. Разработанная тест-система позволяет одновременно выявлять в сыворотке крови пациентов несколько молекулярных маркеров, характеризующих процесс протекания заболевания. Данная система диагностики показала удовлетворительные результаты в процессе предварительной апробации на сыворотках пациентов. В дальнейшем планируется провести клиническую апробацию как выбранных молекулярных маркеров, так и самой тест-системы.

Литература

1. Singer M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) // *Jama*. — 2016. — Т. 315. — №. 8. — С. 801–810.
2. Гельфанд Б. Р. и др. Сепсис: классификация, клинко-диагностическая концепция и лечение. / Под ред. акад. РАН Б. Р. Гельфанда — 4-е изд., доп. и перераб. — Москва : ООО «Медицинское информационное агенство», 2017.
3. Совершенствование профилактики, диагностики и клинического ведения сепсиса. 140 сессия Исполнительного комитета ВОЗ. 2017; EB140/12.
4. Sivak K. V. et al. Adenosine A2A receptor as a drug target for treatment of sepsis // *Molecular Biology*. — 2016. — Т. 50. — №. 2. — С. 200–212.
5. Sepsis. // *Diagnostic Methods and Protocols*. — 2015. — С. 460.
6. Kelly B. J. et al. Combined biomarkers discriminate a low likelihood of bacterial infection among surgical intensive care unit patients with suspected sepsis // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. — 2016. — Т. 85. — №. 1. — С. 109–115.
7. Han J. H. et al. Use of a combination biomarker algorithm to identify medical intensive care unit patients with suspected sepsis at very low likelihood of bacterial infection // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. — 2015. — С. AAC. 00958–15.

8. Rehman A. A., Ahsan H., Khan F. H. alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian // *Journal of cellular physiology*. — 2013. — Т. 228. — №. 8. — С. 1665–1675.
9. Vashist S. K. et al. Emerging human fetuin a assays for biomedical diagnostics // *Trends in biotechnology*. — 2017. — Т. 35. — №. 5. — С. 407–421.
10. Chien S. C. et al. Critical appraisal of the role of serum albumin in cardiovascular disease // *Biomarker research*. — 2017. — Т. 5. — №. 1. — С. 31.
11. Schrödl W. et al. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine // *PROTEOMICS—Clinical Applications*. — 2016. — Т. 10. — №. 11. — С. 1077–1092.
12. Mosesson M. W. Fibrinogen and fibrin structure and functions // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. — 2005. — Т. 3. — №. 8. — С. 1894–1904.
13. Козьмин Ю. П. и др. Прямое введение изотопов O-18 в пептиды и белки для количественного анализа методом масс-спектрометрии // *Биоорганическая химия*. — 2011. — Т. 37. — №. 6. — С. 793–806.
14. Веремеенко К. Н., Голобородько О. П., Кизим А. И. Протеолиз в норме и при патологии // *К.: Здоровья*. — 1988. — Т. 198.

**ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РНК ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА *****PHOTOSENSITIVE RNA FOR REGULATION
OF GENE EXPRESSION AND GENOME EDITING**

Е. А. Хабардина¹, Д. С. Новопашина^{1,2}, И. П. Вохтанцев¹,
Д. О. Жарков^{1,2}, А. Г. Веняминова²

¹ *Новосибирский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

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

E. A. Khabardina¹, D. S. Novopashina^{1,2}, I. P. Vokhtantsev¹,
D. O. Zharkov^{1,2}, A. G. Venyaminova²

¹ *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

² *Institute of Chemical Biology and Fundamental Science SB RAS,
Novosibirsk, Russia*

E-mail: liza.khabardina@mail.ru

Аннотация

Разработаны и оптимизированы два подхода к фоторегулируемой экспрессии генов и фотоконтролируемому редактированию генома. Первый подход связан с активацией siРНК, содержащей блокирующую липофильную группировку, введенную через фоторасщепляемый линкер. Второй подход основан на инактивации направляющей РНК, входящей в состав системы CRISPR/Cas9 и содержащей в своей структуре один или два фотолabile линкера. Активация или инактивация таких олигонуклеотидных конструкций осуществляется воздействием ультрафиолетового облучения.

Abstract

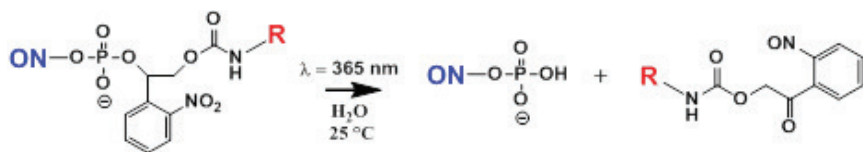
Two approaches to photoregulated gene expression and photocontrolled gene editing were developed and improved. The first approach is related with activation of siRNA, con-

© Е. А. Хабардина, Д. С. Новопашина, И. П. Вохтанцев, Д. О. Жарков, А. Г. Веняминова, 2018.

* Работа выполнена в рамках базовых проектов ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.62.1.4, 0309-2016-0004) «Интеллектуальные материалы для биомедицины» и ПФНИ ГАН на 2017–2020 гг. (VI.62.1.5, 0309-2016-0003) «Синтетическая биология: разработка средств манипуляции генетическим материалом и создание перспективных препаратов для терапии и диагностики».

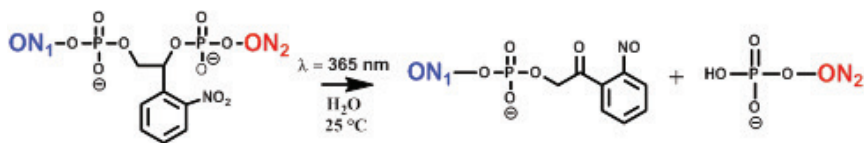
taining blocking lipophilic group attached by means of photocleavable linker. The second approach is based on deactivation of guide RNA for CRISPR/Cas9 system containing one or two photolabile linkers in the structure. Activation or inactivation of these oligonucleotide constructions are caused by ultraviolet radiation.

Актуальной задачей современной молекулярной и синтетической биологии является создание НК-конструкций, действие которых можно регулировать. Одним из способов контроля активности олигонуклеотидных конструкций в клетках во времени и пространстве является использование фотоактивируемых структур в составе олигонуклеотидов [1–3], например, фоторасщепляемых линкеров. Наличие фоторасщепляемого линкера между олигонуклеотидом и группировкой (липофильной, репортерной и др.) позволяет удалять ее путем УФ-облучения в определенный момент времени, например, после проникновения олигонуклеотида в клетку. При этом высвобождается функциональная НК-конструкция (антисенс-олигонуклеотид, siРНК и др.), «свободная» от дополнительных группировок:



R — липофильная блокирующая группа; **ON** — олигорибонуклеотид или олигодезоксирибонуклеотид

Другой подход основан на использовании олигонуклеотидных конструкций, содержащих фоторасщепляемый линкер внутри цепи. В результате УФ-облучения такая конструкция разрушается с образованием двух коротких олигонуклеотидов и происходит потеря ее функциональной активности:



ON₁ и **ON₂** — фрагменты олигорибонуклеотида

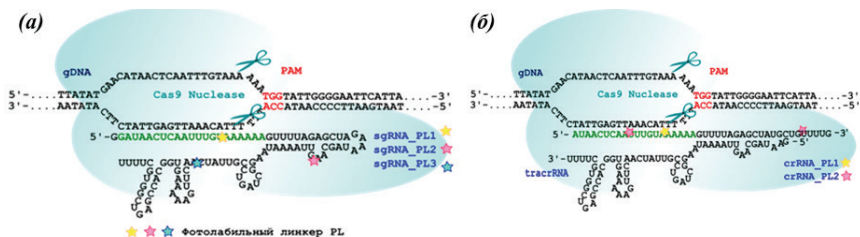
Таким образом УФ-облучение может быть использовано как для контролируемой активации, так и для инактивации олигонуклеотидных конструкций в клетке. Используемый для облучения диапазон длин волн (> 360 нм)

находится далеко за пределами полосы УФ-спектра, повреждающей биологические молекулы, и практически не вызывает мутаций [4], что в свою очередь не повышает риск онкогенной трансформации клеток при облучении.

Целью данной работы являлась разработка подхода к получению конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остатки липофильных молекул (холестерин, токоферол и др.), введенных через фоторасщепляемый линкер, а также получение направляющих РНК для системы CRISPR/Cas9 (sgРНК, crРНК/tracrРНК), содержащих фотолинкер внутри цепи, и исследование расщепления группировок под действием ультрафиолетового излучения в составе олигонуклеотидов и конъюгатов.

С использованием специально синтезированного амидофосфитного синтона на основе 1-(2-нитрофенил)-1,2-этандиола получены полимерсвязанные олигодезоксирибо- и олигорибонуклеотиды, содержащие фоторасщепляемый линкер на 5'-конце. На их основе путем активации дисукцинимидилкарбонатом свободной гидроксильной группы линкера с последующим взаимодействием с аминоксодержащими липофильными производными в твердофазном варианте получены 5'-липофильные производные олигонуклеотидов. Продемонстрирована возможность расщепления фотолинкера под действием УФ-света и высвобождения целевого олигонуклеотида.

Возможность получения протяженных направляющих РНК, в том числе и sgРНК, путем химического синтеза открывает широкие возможности введения модификаций в состав таких РНК с целью увеличения устойчивости РНК конструкции к действию нуклеаз, усиления ее способности связываться с мембраной клетки и проникать внутрь, а также изменения сродства к ДНК-мишени и/или белку Cas9 [5]. Фосфитамидным методом в оптимизированных условиях нами были получены как химерные направляющие sgРНК (102 нуклеотида), так и пары crРНК (36 и 42 нуклеотида) и tracrРНК (67 и 74 нуклеотида) и их аналоги, содержащие одну или две фоторасщепляемые вставки в участках, комплементарных модельной ДНК-мишени, и/или в участках взаимодействия с белком Cas9 (см. рисунок). Показана воз-



Использованные в работе фотолабильные sgРНК (a) и crРНК (b) в составе системы CRISPR/Cas9

возможность их расщепления под действием УФ-света; продемонстрирована высокая эффективность белка Cas9 расщеплять плазмидную ДНК-мишень *in vitro* в их присутствии до облучения и значительное снижение эффективности расщепления после облучения фоточувствительных направляющих РНК как в комплексе с белком Cas9, так и индивидуально в растворе. Продemonстрирована возможность контролируемой остановки действия CRISPR-системы в определенный момент времени.

В данной работе разработаны и оптимизированы подходы к контролируемой регуляции экспрессии генов и редактированию генома с использованием фотолabileльных РНК-конструкций.

Литература

1. Nguyen Q. N., Chavli R. V., Marques J. T. et al. Light controllable siRNAs regulate gene suppression and phenotypes in cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006, V. 1758. N. 3. P. 394–403.
2. Mikat V., Heckel A. Light-dependent RNA interference with nucleobase-caged siRNAs. *RNA* 2007, V. 13. N. 12. P. 2341–2347.
3. Ankenbruck N., Courtney T., Naro Y., Deiters A. Optochemical control of biological processes in cells and animals. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, V.57. N. 11. P. 2768–2798.
4. Setlow R. B. Shedding light on proteins, nucleic acids, cells, humans and fish. *Mutat. Res.* 2002, V.511. N.1. P.1–14.
5. Hendel A., Bak R. O., Clark J. T. et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* 2015, V. 33. N. 9. P. 985–989.

**РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ TDP1,
ОСНОВАННЫХ НА ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ***

**DEVELOPMENT OF TDP1 INHIBITORS BASED ON NATURAL
BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS**

А. А. Чепанова¹, А. Л. Захаренко¹, О. Д. Захарова¹,
Е. С. Ильина¹, Т. М. Хоменко², Е. С. Можайцев²,
Е. В. Суслов², Н. С. Ли-Жуланов², А. С. Филимонов²,
О. А. Лузина², К. П. Волчо², Н. Ф. Салахутдинов¹, О. И. Лаврик¹

¹ *Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SBRAS,
630090, Russian Federation, Novosibirsk,
Akademika Lavrentieva Ave., 8*

² *N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry,
SBRAS, 630090, Russian Federation, Novosibirsk,
Akademika Lavrentieva Ave., 9*

E-mail: arinachepanova@mail.ru

Аннотация

Ингибирование ферментов системы репарации относится к перспективным методам по созданию эффективной противораковой терапии, особенно для лекарственно-устойчивых опухолей. Tdp1 является многообещающей мишенью противораковой терапии, поскольку может восстанавливать повреждения ДНК, вызванные ингибиторами Top1, что приводит к резистентности к лекарственным средствам. Четыре класса веществ, основанных на природных биологически активных соединениях (производные кумарина, монотерпенов, хромена и усниновой кислоты), тестировались *in vitro* для выявления ингибирующей активности в отношении Tdp1 с использованием флуоресцентного анализа. Было показано, что все изученные соединения обладают ингибирующим эффектом. Влияние выбранных соединений на пролиферацию линий опухолевых клеток и оценку гибели клеток изучали с использованием МТТ теста. Среди разработанных ингибиторов имеются как умеренно токсичные, так и нетоксичные соединения.

Abstract

Developing inhibitors of DNA repair enzymes is a promising approach to improve anticancer therapy, particularly for drug-resistant tumors. Tdp1 is a promising target for

© А. А. Чепанова, А. Л. Захаренко, О. Д. Захарова, Е. С. Ильина, Т. М. Хоменко, Е. С. Можайцев, Е. В. Суслов, Н. С. Ли-Жуланов, А. С. Филимонов, О. А. Лузина, К. П. Волчо, Н. Ф. Салахутдинов, О. И. Лаврик, 2018.

* This work was supported by Russian Science Foundation (grant 16-13-10074).

anticancer therapy, since it can repair DNA lesions caused by Top1 inhibitors leading to drug resistance. Four classes of inhibitors based on natural compounds (derivatives of coumarin, monoterpenoids, chromen and usnic acid) were tested in vitro Tdp1 inhibitory activity using a fluorescent-based assay. It was shown that all studied compounds have a pronounced inhibitory effect. The effect of the selected compounds on the proliferation of transplanted tumor cell lines and the evaluation of cell death were studied using the MTT test. Among the developed inhibitors, there are both moderately toxic and non-toxic compounds.

Synthetic transformation of natural biologically active metabolites to design novel drugs is a successful strategy in medicinal chemistry. During the period between the 1940s and 2014, 49 % of anticancer pharmaceuticals introduced to clinical practice were either natural compounds or their derivatives [1].

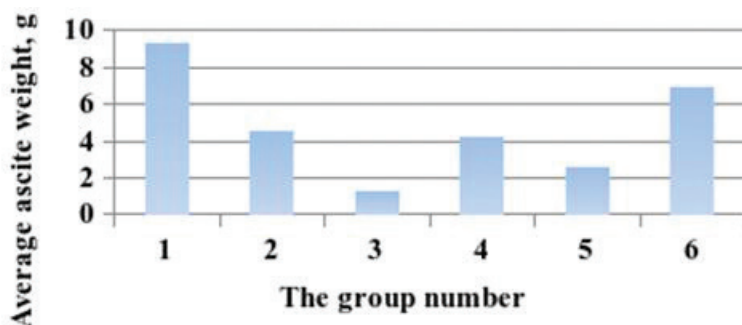
Monoterpenoids, the plant secondary metabolites, are known to possess activity against certain cancer cell lines. Compounds carrying the adamantane moiety exhibit a broad range of biological activities. Some of them are active against different types of cancer. We have synthesized a series of compounds with both the diaza-adamantane and monoterpenoid moieties and tested their inhibitory activity against purified recombinant DNA repair enzyme Tdp1. Compound synthesized from 1-aminoadamantane and myrtenal, and compound produced from 2-aminoadamantane and citronellal were found to be most potent as they inhibited Tdp1 with IC₅₀ values of 6 and 3.5 μ M, respectively. These compounds proved to have low cytotoxicity in HCT-116 cells (IC₅₀ > 50 μ M) [2].

Octahydro-2H-chromene is an oxygen-containing heterocycle with tetrahydropyran moiety occurring in many important natural products and biologically active molecules. The novel amide and adamantane derivatives of octahydro-2H-chromen-4-ol were synthesized from the monoterpenoid (-)-isopulegol. Adamantane derivatives are widely used in medicinal chemistry and clinical practice. The introduction of an adamantyl moiety into biologically active molecules often decreases toxicity and improves therapeutic effect [2,3]. Therefore, combining these two molecular scaffolds is a promising approach to develop potent anticancer agents. The series of chiral heterocyclic compounds with the octahydro-2H-chromene scaffold, containing amide substituents, was synthesized in the three-step reaction for the first time. All derivatives were tested and IC₅₀ values were determined. It was found that the octahydro-2H-chromen-4-ol derivative with 1-adamantane moiety appeared to be an effective inhibitor of Tdp1 with IC₅₀ value of 1.24 μ M.

Coumarin (chromen-2-OH) and its derivatives are widely distributed in nature, mainly in plants. It is known that coumarins possess different types of biological activity and are used in medical chemistry [4]. In 2016, our team had published the

article in which it was shown that the 7-hydroxycoumarin derivatives with monoterpene pinene moiety are effective inhibitors of Tdp 1 [5]. This compound had low cytotoxicity enhanced the cytotoxicity of camptothecin, an established topoisomerase 1 poison, was demonstrated. We continued the work with compounds of this class. New modifications of compounds have been proposed. All new derivatives were tested and resulting in IC_{50} values in the of 0.41–4.3 μM range.

One of the compounds was tested in mice. The inhibitor was injected intraperitoneally into the Krebs ascite carcinoma. The coumarin derivative sufficiently improved effect of topotecan and the coumarin derivative suppressed tumor growth at mice as shown (see figure).



The influence different concentration of inhibitor in presence of topotecan (**tpc**) on average ascite weight. **1** — control, **2** — **tpc** 0.5 mg/kg, **3** — **tpc** 0.5 mg/kg + **inh** 80 mg/kg, **4** — **tpc** 0.5 mg/kg + **inh** 40 mg/kg, **5** — **tpc** 0.5 mg/kg + **inh** 20 mg/kg, **6** — **inh** 80 mg/kg. **inh** — means Tdp1 inhibitor

Usnic acid is a secondary metabolite commonly found in various types of lichens, which has a broad range of biological activities: antitumor, antiviral, antibiotic, analgesic, antimycotic and insecticide [6,7]. It has been previously found that usnic acid derivatives are effective Tdp1 inhibitors with significant synergistic effect on the viability of the MCF-7 breast cancer cell line [5]. The derivatives of usnic acid were evaluated for their Tdp1 inhibitory activity *in vitro*. Overall, most of the tested (het)arylidene-furanone derivatives of usnic acid demonstrated potent anti-Tdp1 activity in submicromolar, or even nanomolar, concentration [8]. To study cytotoxicity on A-549 and HEK-293 cells, the most effective Tdp1 inhibitors were selected. The cells were incubated in the presence of the inhibitors at concentrations ranging from 1 to 100 μM . The compounds proved to be moderately toxic for the cells (CC_{50} values in the range from 4.6 to 20 μM) except for compound 6s, for which CC_{50} value could not be determined for both cell lines ($> 50 \mu M$) [8].

Conclusion

All studied compounds have a pronounced inhibitory effect and they improve the effect of tpc. The dependence of the inhibitory activity on the structure of the compounds was revealed. Among the developed inhibitors, there are both moderately toxic and non-toxic compounds. The most effective compounds are very perspective and will be studied further.

Literature

1. Newman D. J., Cragg G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 // *Journal of Natural Products*. 2016. Vol. 79, № 3. P. 629–661.
2. Ponomarev K. Y. et al. Aminoadamantanes containing monoterpene-derived fragments as potent tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 inhibitors // *Bioorg. Chem. Academic Press*, 2018. Vol. 76. P. 392–399.
3. Yasumoto T., Murata M. Marine toxins // *Chem. Rev. American Chemical Society*, 1993. Vol. 93, № 5. P. 1897–1909.
4. Xu L. et al. The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins // *Proceedings of the 2015 Asia-Pacific Energy Equipment Engineering Research Conference*. Paris, France: Atlantis Press, 2015.
5. Khomenko T. et al. New inhibitors of tyrosyl-DNA phosphodiesterase I (Tdp 1) combining 7-hydroxycoumarin and monoterpeneoid moieties // *Bioorg. Med. Chem.* 2016. Vol. 24, № 21. P. 5573–5581.
6. Luzina O. A., Salakhutdinov N. F. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. Activity against unicellular organisms // *Russ. J. Bioorganic Chem. Pleiades Publishing*, 2016. Vol. 42, № 2. P. 115–132.
7. Luzina O. A., Salakhutdinov N. F. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 2. effects on higher organisms. Molecular and physicochemical aspects // *Russ. J. Bioorganic Chem. Pleiades Publishing*, 2016. Vol. 42, № 3. P. 249–268.
8. Zakharova O. et al. Synthesis and evaluation of aryliden- and hetarylidenfuranone derivatives of usnic acid as highly potent Tdp1 inhibitors // *Bioorganic Med. Chem. Elsevier*, 2018. Vol. 26, № 15. P. 4470–4480.

**ВВЕДЕНИЕ ГЕТАРИЛЬНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ
В СТРУКТУРУ ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ
УСИЛИВАЕТ ЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ
И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ***

**INTRODUCTION OF HETARYL SUBSTITUENTS INTO
GLYCYRRHETINIC ACID SCAFFOLD INCREASES ITS ANTITUMOR
AND ANTI-INFLAMMATORY POTENTIAL**

С. Чэн^{1,2}, А. В. Марков², О. В. Саломатина³,
Н. Ф. Салахутдинов³, М. А. Зенкова², Е. Б. Логашенко²

¹ *Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет, Новосибирск, Россия*

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

³ *Новосибирский институт органической химии
им. Н. Н. Ворожцова СО РАН, Новосибирск, Россия*

X. Chen^{1,2}, A. V. Markov², O. V. Salomatina³, N. F. Salakhutdinov³,
M. A. Zenkova², E. B. Logashenko²

¹ *Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

² *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine
SB RAS, Novosibirsk, Russia*

³ *N. N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry
SB RAS, Novosibirsk, Russia*

Аннотация

Проведен скрининг цитотоксичности 10 новых производных глицирретовой кислоты (ГЛК) в отношении 5 опухолевых клеточных линий. Установлено, что присоединение гетарильных заместителей к карбоксильной группе ГЛК приводит к значительному усилению ее антипролиферативного действия *in vitro*. Выявлены производные sg-623 и spro-13, эффективно подавляющие синтез провоспалительных медиаторов NO и TNF- α мышиными макрофагами, активированными IFN- γ .

© С. Чэн, А. В. Марков, О. В. Саломатина, Н. Ф. Салахутдинов, М. А. Зенкова, Е. Б. Логашенко, 2018.

* Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 17-75-20120).

Abstract

Screening of cytotoxicity of 10 novel chemical derivatives of glycyrrhetic acid (GLA) in a panel of 5 tumor cell lines was performed. It was found that introduction of hetaryl substituents into carboxyl group of GLA highly increased its anti-proliferative activity *in vitro*. Compounds sg-623 and spo-13 were shown to effectively suppress synthesis of pro-inflammatory mediators NO and TNF- α by murine macrophage activated by IFN- γ .

Одним из важных способов поиска и разработки новых эффективных лекарственных препаратов является синтетическая трансформация молекул природных биологически активных соединений, характеризующихся огромным разнообразием молекулярных структур и широким спектром действия. Многие годы природные соединения занимают центральное место в области разработки фармакологических агентов. Одним из примеров природных метаболитов, использующихся в качестве платформы для создания новых лекарственных средств, являются растительные тритерпеноиды. Глицирретовая кислота (ГЛК) представляет собой один из самых распространенных тритерпеноидов олеанолового ряда. Данное соединение содержится в больших количествах в корне солодки. Широкий ареал распространения солодки на территории Российской Федерации, легких способ выделения ГЛК из растительного сырья, широкий спектр ее фармакологических активностей делают данный тритерпеноид перспективным в качестве стартовой молекулы для химической трансформации.

Нами было синтезировано 10 новых производных ГЛК, несущих различные гетарильные заместители в положении С30. Целью данного исследования являлась оценка уровня цитотоксичности синтезированных производных на панели опухолевых клеток и их противовоспалительный потенциал *in vitro*.

Скрининг цитотоксичности производных ГЛК проводили *in vitro* на клетках карциномы шейки матки человека KB-3-1 и HeLa, аденокарциномы прямой кишки HuTu-80 и легких A-549 человека и меланомы мыши B16 методом МТТ-теста. Клетки инкубировали в среде DMEM в присутствии исследуемых соединений (10^{-9} – 10^{-5} М) в течение 24 ч, после чего определяли долю живых клеток по отношению к контролю — клеткам, инкубированным в отсутствие производных. Для каждого производного определяли значение IC_{50} — концентрацию вещества, при которой наблюдается гибель 50 % клеток. Полученные данные представлены в таблице.

Было показано, что введение гетероциклических заместителей в структуру ГЛК может значительно усиливать цитотоксичность — присоединение бензимидамидного (sg-610), трет-бутил оксидиазольного (sg-625), никотиномидамидного (sg-608) и пиколиномидамидного (sg-612) заместителей к карбоксильной группе С30 ГЛК привела к заметному увеличению цитоток-

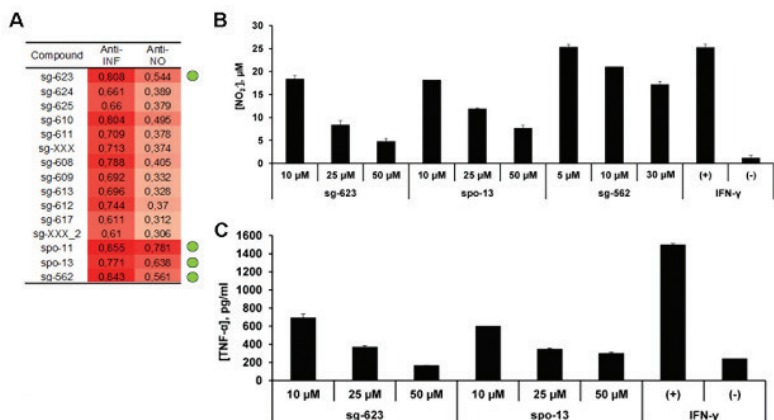
сичности производных в отношении клеток рака шейки матки KB-3-1 ($IC_{50} = 22,3\text{--}32,7$ мкМ против IC_{50} (ГЛК) = 50,8 мкМ) и HeLa ($IC_{50} = 3,7\text{--}11,6$ мкМ против IC_{50} (ГЛК) = 42,3 мкМ), причем клетки линии HeLa оказались значительно более чувствительными к действию данных соединений. Интересно, что среди отмеченных выше производных sg-625 и sg-608, несущие трет-бутил оксидиазольный и никотинимидаmidный заместители, обладали более широким спектром действия, эффективно ингибируя пролиферацию клеток меланомы B16 ($IC_{50} = 11,2$ и 18,9 мкМ, соотв.). Выявленные группировки, приводящие к увеличению антипролиферативной активности, могут рассматриваться в качестве перспективных заместителей для синтеза новых высокоактивных противоопухолевых агентов на основе триртереноидов.

Цитотоксичность новых производных ГЛК

Производные	Значение IC_{50} мкМ				
	KB-3-1	HeLa	B16	HuTu-80	A-549
sg-610	27,2±2,9	8,6±1,8	84,3±7,8	12,3±1,2	21,8±7,1
sg-623	> 100	> 100	> 100	87±8,1	> 100
sg-625	22,3±3,7	3,7±0,9	11,25±1,9	8,8±1,1	23,5±6,3
sg-608	24,8±2,7	11,6±1,9	18,9±5,2	5,9±2,3	21,9±3,9
sg-612	32,7±2,8	4,5±0,3	> 100	8,7±3,4	54±6,7
sg-613	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
sg-609	61±15,1	84±9,1	> 100	91±8,4	> 100
sg-617	> 100	> 100	83±7,9	34±5,1	54±6,2
sg-562	38,5±4,2	Н.д.	Н.д.	Н.д.	> 100
spo-13	> 100	Н.д.	Н.д.	Н.д.	> 100
ГЛК	50,8±1,5	42,3±2,2	35±2,0	>50	>50

Примечание. Н. д. — нет данных; ГЛК — глицирретовая кислота.

Оценку противовоспалительного потенциала новых производных ГЛК проводили в два этапа. На первом этапе был проведен отбор наиболее перспективных молекул путем *in silico* скрининга наличия у исследуемых соединений потенциальной анти-NO (NO — важный провоспалительный медиатор) и противовоспалительной активности с помощью ресурса PASS Online (Институт биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича, Москва). Результаты данного скрининга вынесены в таблицу, представленную на рисунке. Для дальнейших работ по оценке способности новых производных подавлять синтез провоспалительных медиаторов NO и TNF- α , были выбраны производные sg-623, spo-13 и sg-562, обладающие наивысшими показателями P_A (вероятности наличия активности у соединения по данным



Оценка противовоспалительного потенциала производных ГЛК, несущих гетарильные заместители. А) Скрининг *in silico* способности исследуемых производных проявлять противовоспалительную (Anti-INF) и анти-NO (Anti-NO) активность. Анализ с помощью PASS Online. В таблице представлены значения P_A — вероятности наличия у соединений искомой активности. Во всех проанализированных случаях $P_A \gg P_i$ (вероятности отсутствия активности). Зелеными точками отмечены производные, взятые нами на второй раунд противовоспалительного скрининга — оценку анти-NO активности. В) Эффект производных ГЛК на синтез NO макрофагами мыши RAW264.7, активированными IFN- γ . Концентрацию нитрита в надклеточной среде определяли с помощью набора реагентов Griess Reagent System (Promega, США). С) Эффект производных ГЛК на экспрессию TNF- α макрофагами мыши RAW264.7, активированными IFN- γ . Уровень экспрессии провоспалительного цитокина определяли с помощью набора Mouse TNF α ELISA Kit (Thermo Scientific, США)

PASS). Макрофагальные клетки мыши RAW264.7 активировали рекомбинантным мышинным IFN- γ (20 нг/мл) и инкубировали в присутствии нетоксических концентраций указанных соединений в течение 24 часов, после чего определяли концентрацию нитрита (являющегося основным продуктом окисления NO) и TNF- α в надклеточной среде с помощью Griess Reagent System (Promega, США) и Mouse TNF α ELISA Kit (Thermo Scientific, США), соответственно.

Показано, что производные sg-623 и spo-13 достоверно снижали синтез NO — значения их $IC_{50}^{(NO)}$ оказалось равным $18,6 \pm 1,1$ и $23,4 \pm 1,3$ мкМ, соответственно (см. рисунок), в то время как sg-562 практически не обладал анти-NO активностью. Кроме этого, sg-623 и spo-13 эффективно подавляли экспрессию TNF- α активированными макрофагами до базального уровня.

**ЭФФЕКТЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ
НЕЙРОТРОФИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ
В ОБЛАСТЯХ НЕОНАТАЛЬНОГО ГОЛОВНОГО МОЗГА
С МОНОАМИНЕРГИЧЕСКОЙ ИННЕРВАЦИЕЙ***

EFFECTS OF GLUCOCORTICOIDS ON THE EXPRESSION OF
NEUROTROPHINS AND THEIR RECEPTORS IN AREAS OF THE
NEONATAL BRAIN WITH MONOAMINERGIC INNERVATION

Е. В. Шабурова^{1,2}, Д. А. Ланшаков², Т. С. Калинина^{1,2}, Н. Н. Дыгало^{1,2}

¹ ФГБОУ ВПО «Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», Россия

² ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия

E. V. Shaburova^{1,2}, D. A. Lanshakov², T. S. Kalinina^{1,2}, N. N. Dygalo^{1,2}

¹ NSU, Russia

² ICG SB RAS, Russia

Аннотация

У неонатальных крысят исследовали эффекты дексаметазона на уровни мРНК 9 генов: нейротрофинов и их рецепторов в стволе головного мозга, в котором локализованы клеточные тела моноаминергических нейронов, а также в префронтальной коре, содержащей проекции этих нейронов. В течение первого часа после введения гормона наблюдалось повышение уровней мРНК рецепторов зрелых форм нейротрофинов (TrkB, TrkC, SorCS1), а к 4–6 часу снижалась экспрессия мРНК рецепторов их проапоптозных форм (p75, SorCS3). Уровни мРНК самих нейротрофинов начинали повышаться в первые часы после гормонального воздействия, а некоторые оставались повышенными через 24–120 часов. Следовательно, глюкокортикоиды влияют на нейротрофические процессы в областях тел и отростков моноаминергических нейронов формирующегося головного мозга.

Abstract

This study is devoted to research the effects of dexamethasone treatment on the mRNA levels of 9 genes, included neurotrophins and their receptors. Measurements were carried out in the brain stem, in which the cellular bodies of monoaminergic neurons are localized, and in the prefrontal cortex, which contains the projections of these neurons. During the first hour after hormone administration, the mRNA levels of the receptors for mature forms

© Е. В. Шабурова, Д. А. Ланшаков, Т. С. Калинина, Н. Н. Дыгало, 2018.

* Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ гранты 18-315-00114 (мол_а), 16-34-60103.

of neurotrophins (TrkB, TrkC) were increased, and mRNA expression of receptors for their proapoptotic forms (p75, SorCS3) decreased between 4–6 hours. The mRNA levels of the neurotrophins began to rise since first hour after treatment, and some of them remained elevated after 24–120 hours. Consequently, glucocorticoids affect neurotrophic processes in the areas of monoaminergic neurons bodies and projections in the developing brain.

Терапия глюкокортикоидами используется для предупреждения респираторного дистресс-синдрома у новорожденных при угрозе преждевременных родов. Метод давно и прочно вошел в медицину, однако накопилось большое количество свидетельств негативного влияния глюкокортикоидов на развитие плода и, в частности, на формирование его нервной системы. При этом, точные молекулярные и клеточные мишени действия глюкокортикоидов в развивающемся мозге до сих пор остаются невыясненными.

Важнейшими регуляторами развития головного мозга являются нейротрофины — регуляторные белки нервной ткани. Известно, что развитие нервной системы сопровождается сложными последовательными изменениями чувствительности к нейротрофинам (стимулирующим пролиферацию, дифференцировку и выживаемость нейронов и увеличивающим количество их проекций) и их проформам (запускающими программу апоптоза) в определенных популяциях клеток нервной ткани. Это осуществляется не только изменением экспрессии самих нейротрофинов и пронеуротрофинов, но и рецепторов к ним. Таким образом, проанализировав паттерны экспрессии белков нейротрофической системы в какой-либо области головного мозга, можно предугадать ее дальнейшее развитие. Моноаминергические (серотониновые, дофаминовые, норадренергические и т. д.) нейроны, тела которых локализованы в стволе головного мозга, а их отростки проецируются практически во все отделы, включая кору, здесь представляют наибольший интерес в связи с интенсивными перестройками, происходящими в этих нейронах в неонатальный период (на основе анализа данных с сайта Allen Brain). Например, при трехкратном введении дексаметазона, дофаминергические нейроны ствола начинают активно пролиферировать, увеличивая количество своих проекций в разные области мозга [Virdee, Mcarthur, 2014].

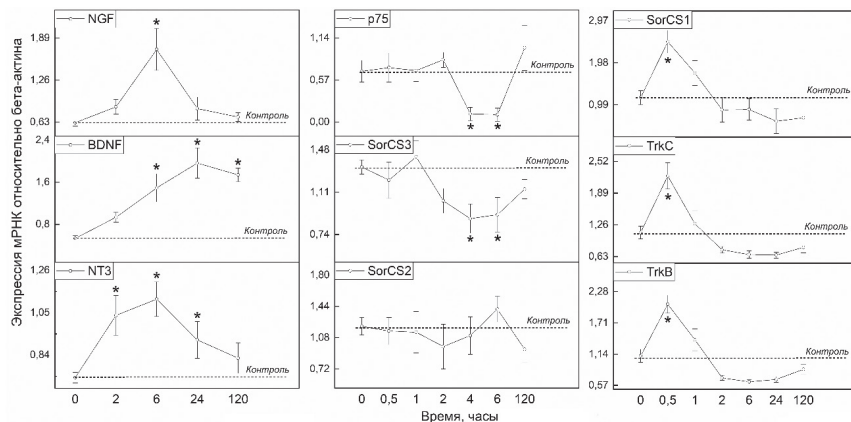
Целью данной работы является исследование влияния однократного введения синтетического глюкокортикоида дексаметазона неонатальным крысам на уровни мРНК 9 генов нейротрофинов и их рецепторов, определяющих рост и пролиферацию нейронов всех типов, в том числе и моноаминергических нейронов, тела которых локализованы в стволе головного мозга.

Так, на третий день жизни неонатальным крысам подкожно была введена терапевтическая доза дексаметазона (0,2 мг/кг). Образцы ткани стволочной части головного мозга и префронтальной коры собирались через 0,5 —

120 часов после гормонального воздействия. Экспрессию нейротрофинов (NT3, NGF, BDNF), рецепторов к нейротрофинам (TrkB, TrkC, SorCS1) и их проформам (p75, SorCS2, SorCS3) определяли при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты анализировали однофакторным дисперсионным анализом, достоверными считались различия с $p < 0,05$ по критерию Фишера.

Введение дексаметазона приводило к временному повышению через 6 часов уровней мРНК NT3 [$F_{(8,54)} = 5.21$, $p < 0.05$] и NGF [$F_{(8,58)} = 9.69$, $p < 0.05$] рис.1А, в 1,5 и 2 раза, соответственно, а также к выраженному — в 3 раза — и продолжавшемуся на протяжении 5 дней повышенному уровню мРНК BDNF [$F_{(10,76)} = 7.24$, $p < 0.05$] рис.1А. Одновременно с повышением экспрессии нейротрофинов происходило снижение уровня мРНК рецептора их проформ p75 [$F_{(8,45)} = 4.15$, $p < 0.05$] рис.1С. Уровни мРНК рецептора к проформам SorCS2 [$F_{(7,45)} = 0.87$, $p = 0.5$] не изменялась, но снижалась мРНК SorCS3 [$F_{(7,54)} = 2.0837$, $p < 0.05$] рис.1С. Рецепторы к зрелым формам нейротрофинов SorCS1, Trk C и Trk B показали одинаковый паттерн экспрессии, достигая пика через 0,5 часов после введения дексаметазона [$F_{(8,87)} = 6.0595$, $p < 0.05$] рис.1В, и также быстро понижая свою экспрессию, что может объясняться активацией нейронов в первые часы после введения глюкокортикоидов, как было показано нами ранее [Lanshakov и др., 2016].

Следовательно, глюкокортикоиды действительно влияют на нейротрофические процессы в областях тел и отростков моноаминергических нейронов формирующегося головного мозга.



Экспрессия мРНК нейротрофинов (1А — BDNF, NGF, NT3) в префронтальной коре, рецепторов к нейротрофинам (1С — SorCS1, Trk C, Trk B) и их проформам (1В — p75, SorCS3, SorCS2) в стволе головного мозга, относительно бета-актина. * — $p < 0,05$, по сравнению с экспрессией мРНК в интактном контроле (пунктирная линия)

Литература

1. Allen Brain Atlas: www.brain-map.org
2. Virdee K., Mcarthur S. Antenatal Glucocorticoid Treatment Induces Adaptations in Adult Midbrain Dopamine Neurons, which Underpin Sexually Dimorphic Behavioral Resilience // *Neuropsychopharmacology* 2014. P. 339–350.
3. Lanshakov D. A. et all. Neurobiology of Disease Dexamethasone-induced acute excitotoxic cell death in the developing brain // *Neurobiol. Dis.* 2016. Vol. 91. P. 1–9.

**ИНСУЛИН ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА C3
В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ HEPG2
ЧЕРЕЗ АКТИВАЦИЮ PPAR γ ***

INSULIN DOWNREGULATES C3 GENE EXPRESSION IN HUMAN
HEPG2 CELLS THROUGH ACTIVATION OF PPAR γ

В. С. Шавва, Е. В. Некрасова, С. В. Орлов

*ФГБНУ Институт экспериментальной медицины,
отдел биохимии
Санкт-Петербургский государственный университет,
кафедра эмбриологии*

V. S. Shavva, E. V. Nekrasova, S. V. Orlov

*Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine,
Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russia
Department of Embryology, St. Petersburg State University,
St. Petersburg, Russia*

E-mail: katherina.nekrasova@gmail.com

Аннотация

Инсулин относится к метаболическим гормонам. Дисфункция инсулинового сигналинга является причиной диабета второго типа и способствует развитию метаболического синдрома. Воспаление, как известно, ингибирует инсулиновый сигналинг. C3 — белок острой фазы воспаления. Повышенный уровень плазматического C3 коррелирует с повышенным уровнем инсулина, с инсулинорезистентностью и, по-видимому, является фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний и атеросклероза. Инсулин регулирует экспрессию провоспалительных генов.

Abstract

Metabolic hormone insulin is a crucial regulator of metabolism. Malfunctions of insulin signaling are the causes of type two diabetes and are known to contribute to the development of the metabolic syndrome. Inflammation was shown to suppress insulin signaling. C3 is an acute phase protein. Elevated level of plasma C3 was shown to correlate with heightened fasting insulin levels and insulin resistance and appears to be a risk factor for the cardiovascular disease and atherosclerosis. Insulin regulates the expression of proinflammatory genes.

© В. С. Шавва, Е. В. Некрасова, С. В. Орлов, 2018.

* This work was supported by Russian Science Foundation (Grant № 17-15-01326).

Objective

As complement component C3 was shown to be associated with the development of metabolic syndrome, we asked if insulin was capable of regulating C3 production in the main source of plasma C3 — hepatocytes.

Methods

Real Time RT-PCR, ELISA, Western blotting, Chromatin immunoprecipitation, DNA-affinity precipitation.

Results

Insulin downregulates C3 gene expression in human HepG2 cells through activation of PI3K, mTORC1, p38 and MEK1/2 signaling pathways. Inhibition of PI3K, JNK, mTORC1 and MEK1/2 prevented insulin-induced decrease of C3 protein secretion. Transcription factors PPAR α , PPAR γ , HNF4 α and NF- κ B are important for this process. Insulin activates PPAR γ through PI3K/Akt/mTORC1 pathway, resulting in PPAR γ binding to DR4 and DR0 elements within the C3 promoter and subsequent displacement of HNF4 α and PPAR α from these sites. As a result PPAR α /NF- κ B complex, which exists on C3 promoter, is broken down and C3 gene expression is downregulated. The promoter of murine C3 gene does not contain DR4 element and the murine C3 gene is upregulated by insulin in a PPAR γ -independent manner.

Conclusion

Insulin and PPAR γ ligand GW1929 downregulate C3 gene expression and protein secretion in human HepG2 cells. Given the proinflammatory role of C3 and its association with metabolic syndrome, this effect likely represents the anti-inflammatory function of insulin.

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ

Абрамова Е. Г.	38	Баранова С. В.	69
Авдеева Н. Г.	126	Батлук У. И.	253
Акбердин И. Р.	56	Баторов Е. В.	232
Акимова А. С.	179	Бауэр Т. В.	150
Алехина Т. А.	343	Бекболотов А. А.	228
Ананьина Л. Н.	97	Белоусов А. Д.	126
Андреева Е. А.	232	Бердюгин А. А.	16
Андреева Н. Б.	3, 359	Бибиков Д. Н.	26
Аникина А. Ю.	228	Бобрикова Е. Н.	20
Антонец Д. В.	275, 369	Бобров М. Ю.	7
Антонычева М. В.	126	Бобровских А. В.	24
Ануфриева К. С.	287	Богачев С. С.	355
Апалько С. В.	255	Богачева Н. В.	294
Архипова А. С.	60	Боковая О. В.	136, 152
Асанова С. Е.	225	Болдырева Д. С.	255
Астафьева С. В.	126	Бондарь А. А.	84
Аулова К. С.	239	Бондарь Н. П.	253
Ашба А. М.	7	Борисова С. В.	26
Бабич В. О.	242	Бочкова М. С.	48
Бабич П. И.	10	Боярских У. А.	311
Бадарин С. А.	26	Булаев А. Г.	29
Бажан Н. М.	246	Буланович Ю. А.	154
Бажан С. И.	275, 369	Булыгина В. В.	379
Байборodin С. И.	355	Буракова Е. А.	328
Байков И. К.	136, 141	Бурдеева К. В.	253
Баймухаметова А. М.	146, 170	Васильева А. Д.	203
Байрамова Д. О.	13	Васиховская В. А.	34
Байсейит С. Б.	146, 148	Вахрушина Н. И.	126
Бакулина А. Ю.	3, 359	Веньяминова А. Г.	387
Балахонова Е. А.	322, 331	Власов В. В.	328
Балыбина Н. Ю.	246	Волосникова Е. А.	45
Балык К. В.	250	Волох О. А.	26, 126
Банковска К. Б.	206	Волченко Н. Н.	60

Волчо К. П.	391	Есина Т. И.	45
Вохтанцев И. П.	387	Ефремов Я. Р.	355
Гавирова Л. А.	29	Жаксылыков Н. Н.	114
Гаврилова Е. В.	150, 187	Жарков Д. О.	387
Гаврилова Ю. А.	38	Жирнов И. В.	13
Гайнутдинов П. И.	258	Жуатай А. Ш.	114
Гашников Н. М.	228	Жуматов К. Х.	213, 225
Гашникова Н. М.	183, 294	Журавина М. А.	283
Гейсман А. Н.	196	Журавлев Е. С.	287, 322, 331
Генералов С. В.	38	Заморина С. А.	48
Герасимова С. В.	13	Запарина О. Г.	292
Германчук В. Г.	100	Зарубин В. Н.	10
Гладышева А. В.	262	Захаренко А. Л.	72, 391
Глазова Н. В.	109	Захарова О. Д.	72, 391
Глебова Т. И.	146	Зеленцова Е. А.	136
Глушченко А. В.	41	Зенкова М. А.	242, 318, 328, 395
Гогина Я. С.	45	Зибарева Л. Н.	129
Гончарова Н. И.	154, 187, 208	Зыбкина А. В.	163, 347
Григорьева Т. Ю.	331	Зырянова Д. П.	294
Гринева Е. Н.	265	Ибрагимова М. К.	159, 166
Грищенко И. В.	353	Ильина Е. С.	72, 391
Гудымо А. С.	154, 187, 208	Ильичева Т. Н.	208
Даниленко Д. М.	203	Иматдинов А. Р.	192
Даниленко Е. Д.	45	Иматдинов И. Р.	107
Данильченко Н. В.	154	Каверина Г. Б.	141
Даулбаева К. Д.	172, 213, 225	Кадырбеков У. К.	228
Дерюшева И. В.	159, 166	Калинина Т. С.	250, 379, 399
Дидыч Д. А.	52, 350	Каплина О. Н.	359, 369
Дмитриенко Е. В.	16, 20	Карамендин К. О.	172, 213, 225
Долгова Е. В.	355	Карпенко Л. И.	3, 275, 359, 369
Дольский А. А.	269	Карпов Д. С.	265
Дорошков А. В.	24	Карташов М. Ю.	179
Дрозд У. С.	271	Касакин М. Ф.	331
Дручинина А. В.	86	Касымбеков Е. Т.	172, 213, 225
Дудко С. Г.	275, 369	Каторкин С. А.	190
Дульцев Ф. Н.	314	Кафтырева Л. А.	255
Дурыманов А. Г.	208	Кель А. Э.	318
Дыгало Н. Н.	271, 379, 399	Кечин А. А.	255
Дылева Ю. А.	279	Кирикович С. С.	355
Дюдеева Е. С.	314	Кириллова Т. Ю.	100
Евсеев В. А.	154	Кисаретова П. Э.	355
Ёлкина Ю. А.	29	Кливлеева Н. Г.	148, 170
Емельянова Л. А.	141	Климов Л. О.	283
Еропкин М. Ю.	203	Клопотова М. Р.	152, 221

Клотченко С. А.	382	Лобкис М. А.	132
Ковалева Г. В.	297	Логашенко Е. Б.	242, 318, 395
Ковалева К. С.	72	Логунов Д. Ю.	196
Ковнер А. В.	258, 292	Локтев В. Б.	262
Кожевников В. А.	38	Ломзов А. А.	314
Кожевникова О. С.	375	Лопез Э.	77
Кожин П. М.	258	Лузина О. А.	391
Козлова Ю. Н.	152, 221	Лукманова Г. В.	148
Кокаев Г. С.	301	Лысенко К. Н.	196
Колосов А. В.	86	Макарова Е. Н.	246
Колосова И. В.	150	Макарова М. А.	255
Колосова Н. П.	154, 187, 208	Максименко Л. В.	183
Колхидова З. А.	301	Максютов А. З.	150
Колчанов Н. А.	355	Максютов Р. А.	150, 187
Кольцова Г. С.	176, 190	Маланин С. Ю.	331
Комиссаров А. В.	26	Малоголовкин А. С.	176, 190
Комиссаров А. Б.	331	Мальцев С. В.	154
Компанеец И. Ю.	69	Мальцева Н. А.	69
Конев В. П.	306	Мамонтова Е. М.	72
Коновалова Н. И.	203	Маркель А. Л.	283
Коновалова С. Н.	262	Марков А. В.	242, 318, 395
Коршунов А. С.	306	Марченко В. Ю.	154, 187, 199, 208
Костылева Н. И.	26	Матвеев А. Л.	141
Кочетов А. В.	13	Матвеева А. М.	322
Кравцов А. Л.	38	Матвиенко Д. А.	325
Кривошеина Е. И.	179	Медина А.	77
Кропанева М. Д.	48	Мельников А. Д.	81
Кузнецов А. И.	52, 179	Мельникова В. Е.	196
Кулешова А. Е.	311	Мельникова Е. А.	29
Кулигина Е. В.	362	Меркульева Ю. А.	84
Куляшов М. А.	56	Микрюкова Т. П.	179, 262
Купрюшкин М. С.	341	Мима К. А.	190
Курская О. Г.	258	Миргородская О. А.	382
Курусъ Н. Н.	314	Мирошниченко С. К.	328
Кыдырманов А. И.	172, 213, 225	Михеев В. Н.	132
Қалқожаева М. Қ.	148, 170	Михеева Э. Р.	64
Лаврик О. И.	72, 391	Можаева Е. В.	331
Лазукин А. А.	60	Можайцев Е. С.	391
Лактионов П. П.	365	Мордвинов В. А.	292
Ланшаков Д. А.	250, 271, 379, 399	Морозова В. В.	136, 152, 221, 362
Латышева Т. В.	343	Морозова Д. Ю.	192
Лебедев Л. Р.	45	Мунгалов Р. В.	335
Ли-Жуланов Н. С.	391	Небова Ю. А.	166
Литти Ю. В.	64	Невинский Г. А.	94, 105, 239

Некрасова Е. В.	339, 403	Резайкин А. В.	217
Никитенко Н. А.	196	Рейниссон Й.	72
Никитин А. А.	339	Риттер Г. С.	355
Никифоров А. К.	26	Рихтер В. А.	287, 362
Николин В. П.	355	Рогожин В. В.	100
Новиков М. С.	196	Розалес Дж.	77
Новопашина Д. С.	387	Розанов А. С.	56
Новоселов А. В.	217	Романенко С. П.	132
Ножевникова А. Н.	64	Рудометов А. П.	3, 359
Нуштаева А. А.	362	Русскова Ю. И.	64
Овалле А.	77	Рыжиков А. Б.	154
Овчинникова М. В.	100	Рыжиков А. Б.	187, 199, 208
Озеров А. А.	196	Рязанова М. А.	343
Онгарбаева Н. С.	146	Савельева А. В.	362
Онхонова Г. С.	199	Савиновская Ю. И.	362
Орлов С. В.	339, 403	Садуакасова М. А.	206
Охлопкова О. В.	86	Сайфудинов З. А.	112
Павлова А. С.	341	Сактаганов Н. Т.	170
Пармон В. Н.	90, 102	Салахутдинов Н. Ф.	242, 318, 391, 395
Пасман Н. М.	232	Саломатина О. В.	242, 318, 395
Патутина О. А.	328	Самков А. А.	60
Пахарукова М. Ю.	292	Самойлова Ю. В.	90, 102
Пельтек С. Е.	56	Сарана А. М.	255
Петрова П. А.	203	Саятов М. Х.	172, 213, 225
Пилигаев А. В.	90, 102	Свердлов Е. Д.	350
Плеканчук В. С.	343	Святченко С. В.	187, 199, 208
Полежаева О. А.	163, 347	Седых С. Е.	94, 105
Полуконова А. В.	350	Сейдалина А. Б.	225
Пономарева Е. П.	262	Семакова А. П.	100
Попова Н. А.	355	Семенов Д. В.	287, 322, 331, 362
Поттер Е. А.	355	Сенькова А. В.	328
Прокудина О. И.	343	Сергеева М. В.	331
Проскура К. В.	365	Середа А. Д.	192
Проскурина А. С.	355	Сидоров В. Ю.	117
Протасов А. В.	382	Синицкий М. Ю.	279
Протопопова Е. В.	262	Синицына Н. В.	26
Пурвиньш Л. В.	94	Скрипкин С. С.	107
Пурвиньш Я. В.	353	Скударнов С. Е.	183
Пышный Д. В.	314	Слепнева А. В.	258
Пьянкова А. А.	97	Сомов А. К.	365
Раев М. Б.	48	Сонец И.	77
Разум К. В.	20	Сорокина К. Н.	90, 102
Ракитина О. А.	52	Спасская Д. С.	265
Рахметова А. Ш.	292	Старостина Е. В.	369

Стахеева М. Н.	365	Фишман В. С.	335
Степанов Г. А.	287, 322, 331, 328	Фофанов М. В.	136, 221
Стучаева А. А.	109	Хабардина Е. А.	387
Субботина К. В.	372	Хабарова А. А.	335
Суворов Г. К.	375	Хан Е. Я.	172, 213, 225
Сулейменова С. А.	172, 213, 225	Хестанова Р. А.	301
Султанов А. А.	206	Холматов К. И.	126
Султанов С. А.	112	Хоменко Т. М.	391
Султанова А. Ж.	114	Хомколова В. В.	228
Сульгин А. А.	117	Хонина Н. А.	232
Суслов Е. В.	391	Храмцов П. В.	48
Суслопаров И. М.	154, 187, 208	Цыганов М. М.	159, 166
Сухарева Е. В.	250, 379	Чаусов Е. В.	262
Тамкович С. Н.	365	Челобанов Б. П.	328
Таранов О. С.	355	Чепанова А. А.	391
Тараскин А. С.	382	Чернова Н. А.	64
Телегина Д. В.	375	Черных Е. Р.	232
Терновой В. А.	262	Чикаев А. Н.	359
Тикунов А. Ю.	221	Чурина М. А.	255
Тикунова Н. В.	136, 141	Чэн С.	395
Тимганова В. П.	48	Шабурова Е. В.	399
Тимофеева М. М.	322	Шавва В. С.	339, 403
Тисленко Д. С.	60	Шаменова М. Г.	146
Титов И. А.	176	Шах Махмуд Р.	331
Ткачёв С. Е.	141	Швалов А. Н.	208, 262
Ткаченко Е. И.	123	Шевелёв Г. Ю.	314
Томилин М. А.	13	Шекунов Е. В.	41
Томилов А. А.	86	Шендер В. О.	287
Тотменин А. В.	183, 228, 294	Шулюпова А. С.	253
Трегубчак Т. В.	150, 208	Щербак С. Г.	255
Тугелбай Г. Е.	114	Щербаков Д. Н.	3, 84, 163, 347, 359
Тугутова Е. А.	365	Эрст А. А.	129
Тумабаева А. И.	114	Юнусова Н. В.	365
Тухватулин А. И.	196	Юрк Д. Е.	132
Усольцева П. С.	217	Юрченко К. С.	41
Ушакова Т. А.	136	Юшина М. Н.	7
Федорова-Гоголина И. А.	7	Яковлева Т. В.	246
Федотова С. А.	369	Яньшолё В. В.	81
Филимонов А. С.	391	Яровая О. И.	72
Филипенко Е. А.	13	Ященко С. В.	183
Филипенко М. Л.	255		
Филиппова Ю. А.	322		
Филоненко Е. С.	129		

ОГЛАВЛЕНИЕ

РАЗДЕЛ 1

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Андреева Н. Б., Рудометов А. П., Бакулина А. Ю., Карпенко Л. И., Щербаков Д. Н. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВ YKUJ И TVI В КАЧЕСТВЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВИЧ-ИММУНОГЕНОВ	3
Ашба А. М., Юшина М. Н., Федорова-Гоголина И. А., Бобров М. Ю. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭНДОКАННАБИНОИДА N-АРАХИДОНОИЛДОФАМИНА НА СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЭКТОПИЧЕСКОГО И ЭУТОПИЧЕСКОГО ЭНДОМЕТРИЯ	7
Бабич П. И., Зарубин В. Н. БИОРИТМЫ И ПРИНЦИП РИТМИЧНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ	10
Байрамова Д. О., Томилин М. А., Жирнов И. В., Филипенко Е. А., Герасимова С. В., Кочетов А. В. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА ОБОЛОЧКИ СР БАКТЕРИОФАГА MS2 В РАСТИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ НА МОДЕЛИ <i>NICOTIANA TABACUM</i>.....	13
Бердюгин А. А., Дмитриенко Е. В. ВЛИЯНИЕ ПАРАМЕТРОВ ДЕТЕКТИРУЕМОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ БИОСЕНСОРом НА ОСНОВЕ ПОЛЕВОГО ТРАНЗИСТОРА СО СТРУКТУРОЙ «КРЕМНИЙ НА ИЗОЛЯТОРЕ».....	16

Бобрикова Е. Н., Разум К. В., Дмитриенко Е. В. ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ С РЕГУЛИРУЕМЫМ ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ НЕЙЛОНА-6 И ЕГО КОМПОЗИТОВ.....	20
Бобровских А. В., Дорошков А. В. МОДЕЛИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ <i>IN SILICO</i>	24
Борисова С. В., Бибиков Д. Н., Комиссаров А. В., Волох О. А., Бадарин С. А., Синицына Н. В., Костылева Н. И., Никифоров А. К. ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ ЗАМОРАЖИВАНИЯ НА КАЧЕСТВО ЛИОФИЛИЗАТОВ ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ	26
Булаев А. Г., Мельникова Е. А., Ёлкина Ю. А., Гавирова Л. А. КОМБИНИРОВАННАЯ ГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ МЫШЬЯКСОДЕРЖАЩЕГО МЕДНО-ЦИНКОВОГО КОНЦЕНТРАТА.....	29
Васиховская В. А. ПОЛУЧЕНИЕ CRISPR-АССОЦИИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА CPF1.....	34
Генералов С. В., Кравцов А. Л., Кожевников В. А., Гаврилова Ю. А., Абрамова Е. Г. ПРОТОЧНАЯ ЦИТОМЕТРИЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ УРОВНЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В ПРЕПАРАТЕ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА	38
Глушченко А. В., Шекунов Е. В., Юрченко К. С. ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ПРИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА	41
Есина Т. И., Волосникова Е. А., Гогина Я. С., Лебедев Л. Р., Даниленко Е. Д. РАЗРАБОТКА МЕТОДА СИНТЕЗА КОНЬЮГАТОВ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА С АЛЕНДРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ.....	45
Кропанева М. Д., Храмцов П. В., Бочкова М. С., Тимганова В. П., Заморина С. А., Раев М. Б. РАЗРАБОТКА МЕТОДА СИНТЕЗА БИОКОНЬЮГАТОВ НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ТВЕРДОФАЗНОГО ЯМР-АНАЛИЗА.....	48

Кузьмич А. И., Ракитина О. А., Дидыч Д. А. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ГИСТОНОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДНК В КЛЕТКИ ОПУХОЛЕВОЙ СТРОМЫ	52
Куляшов М. А., Акбердин И. Р., Розанов А. С., Пельтек С. Е. ИЗУЧЕНИЕ ПУТЕЙ АССИМИЛЯЦИИ УГЛЕРОДА В <i>GEOBACILLUS ICIGIANUS</i> НА ОСНОВЕ МЕТОДА ПОТОКОВОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ.....	56
Лазукин А. А., Волченко Н. Н., Самков А. А., Тисленко Д. С., Архипова А. С. ОЦЕНКА ПРИМЕНЕНИЯ МИКРОБНОГО ТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА НА ДНЕ ПРИБРЕЖНОЙ ЗОНЫ ЧЕРНОГО МОРЯ	60
Литти Ю. В., Русскова Ю. И., Чернова Н. А., Ножевникова А. Н., Михеева Э. Р. ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ МАТЕРИАЛОВ НА СКОРОСТЬ ПОТРЕБЛЕНИЯ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ТЕРМОФИЛЬНЫМ МЕТАНОГЕННЫМ СООБЩЕСТВОМ МИКРООРГАНИЗМОВ	64
Мальцева Н. А., Компанец И. Ю., Баранова С. В. ОСОБЕННОСТИ ГИДРОЛИЗА ГИСТОНА H1 И ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.....	69
Мамонтова Е. М., Ковалева К. С., Захаренко А. Л., Яровая О. И., Рейннисон Й., Захарова О. Д., Ильина Е. С., Лаврик О. И. ИНГИБИТОРЫ ФЕРМЕНТА РЕПАРАЦИИ ДНК ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 (TDP1) И ЕГО ПРИРОДНОГО МУТАНТА SCAN1 КАК ПРОТОТИПЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ.....	72
Медина А., Овалле А., Лопез Э., Розалес Дж., Сонец И. ЗАПОЛНЕНИЕ ПРОБЕЛОВ ПРОЕКТНОГО ГЕНОМА <i>S. PASTORIANUS</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ILLUMINA	77
Мельников А. Д., Яньшолу В. В. ОБНАРУЖЕНИЕ БИОМАРКЕРОВ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ЯЗВЫ МЕТОДАМИ МЕТАБОЛОМИКИ	81
Меркульева Ю. А., Бондарь А. А., Щербаков Д. Н. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С <i>BACILLUS THURINGIENSIS</i>.....	84

Охлопкова О. В., Томилов А. А., Дручинина А. В., Колосов А. В. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СКОРОСТЬ ДОСТИЖЕНИЯ ЦЕЛЕВОГО ВОЗРАСТА НЕПАРНЫМ ШЕЛКОПРЯДОМ (LYMANTRIA DISPAR L)	86
Пилигаев А. В., Сорокина К. Н., Самойлова Ю. В., Пармон В. Н. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ШТАММОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ И КРАХМАЛА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССАХ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОЭНЕРГЕТИКЕ	90
Пурвиныш Л. В., Седых С. Е., Невинский Г. А. ЭКЗОСОМЫ МОЛОКА: ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ, АНАЛИЗ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ	94
Пьянкова А. А., Ананьина Л. Н. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА CHROMONALOBACTER SP. TC193 ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ БИОСИНТЕЗА ЭКТОИНА	97
Рогожин В. В., Овчинникова М. В., Кириллова Т. Ю., Семакова А. П., Германчук В. Г. ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ АНЕСТЕЗИИ ЖИВОТНЫМ-ПРОДУЦЕНТАМ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК	100
Самойлова Ю. В., Пилигаев А. В., Сорокина К. Н., Пармон В. Н. КОЭКСПРЕССИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЭСТЕРАЗЫ БАКТЕРИИ <i>UREIBACILLUS THERMOSPHERICUS</i> С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ШАПЕРОНАМИ В <i>E. COLI</i> И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕЕ СВОЙСТВ	102
Седых С. Е., Невинский Г. А. БИСПЕЦИФИЧНЫЕ ИММУНОГЛОБУЛИНЫ: СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ	105
Скрипкин С. С., Иматдинов И. Р. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИГЕНОВ ВИРУСА ЛАССА В ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ ЭКСПРЕССИИ	107
Стучаева А. А., Глазова Н. В. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ	109

Султанов С. А., Сайфудинов З. А. БЫСТРОЕ ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА RPOV И KATG В КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ M. TUBERCULOSIS С ПОМОЩЬЮ HAIN Mtb/DR SL У ДЕТЕЙ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ	112
Султанова А. Ж., Тумабаева А. И., Жуатай А. Ш., Жаксылыков Н. Н., Тугелбай Г. Е. ИЗУЧЕНИЕ АНТИФУНГАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ПОЛИЕНОВОВОГО АНТИБИОТИКА РОЗЕОФУНГИНА В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КАНДИДОЗНОГО ВУЛЬВОВАГИНИТА	114
Сульгин А. А., Сидоров В. Ю. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК АОРТЫ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ТЕСТИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВ И МОДЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ	117
Ткаченко Е. И. ПОВЫШЕНИЕ КОРРОЗИОННОЙ СТОЙКОСТИ СТАЛИ 12Х18Н10Т, ПОЛУЧЕННОЙ МЕТОДОМ ВНЕВАКУУМНОЙ ЭЛЕКТРОННО-ЛУЧЕВОЙ НАПЛАВКИ	123
Холматов К. И., Антонычева М. В., Волох О. А., Вахрушина Н. И., Белоусов А. Д., Астафьева С. В., Авдеева Н. Г. ПРИМЕНЕНИЕ КАСКАДНОЙ ФИЛЬТРАЦИИ В ПРИГОТОВЛЕНИИ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ, ИСПОЛЪЗУЕМОЙ ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ВАКЦИННОГО ШТАММА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА	126
Эрст А. А., Зибарева Л. Н., Филоненко Е. С. СТРАТЕГИЯ УСИЛЕНИЯ БИОСИНТЕЗА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ЭКДИСТЕРОИДОВ В КУЛЬТУРЕ <i>Hairy roots</i> ВИДОВ РОДА <i>SILENE L.</i>	129
Юрк Д. Е., Михеев В. Н., Романенко С. П., Лобкис М. А. ПРОДУКТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ БИОИНЖЕНЕРИИ	132

РАЗДЕЛ 2

ВИРУСОЛОГИЯ

Байков И. К., Зеленцова Е. А., Морозова В. В., Ушакова Т. А., Боковая О. В., Фофанов М. В., Тикунова Н. В. МАСС- СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СТРУКТУРНЫХ БЕЛКОВ ЛИТИЧЕСКОГО БАКТЕРИОФАГА PM135, ПОРАЖАЮЩЕГО <i>PROTEUS MIRABILIS</i>	136
Байков И. К., Матвеев А. Л., Ткачѳ С. Е., Емельянова Л. А., Каверина Г. Б., Тикунова Н. В. АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХИМЕРНОГО АНТИТЕЛА CN14D5 С ТРЕТЬИМ ДОМЕНОМ ГЛИКОПРОТЕИНА Е РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА	141
Баймухаметова А. М., Байсейіт С. Б., Онгарбаева Н. С., Шаменова М. Г., Глебова Т. И. ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ГРИППА А И В СРЕДИ НАСЕЛЕНИЯ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ СЕЗОНЫ 2017–2018 ГГ. НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН	146
Байсейіт С. Б., Қалқожаева М. Қ., Лукманова Г. В., Кливлеева Н. Г. АНАЛИЗ ЭПИДСИТУАЦИИ ПО ГРИППУ В 2017–2018 ГГ. В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН	148
Бауэр Т. В., Трегубчак Т. В., Максютов А. З., Колосова И. В., Гаврилова Е. В., Максютов Р. А. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>	150
Боковая О. В., Козлова Ю. Н., Клопотова М. Р., Морозова В. В. ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИОФАГА KP8, СПЕЦИФИЧНОГО К БАКТЕРИИ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIA</i>	152
Гудымо А. С., Евсеенко В. А., Колосова Н. П., Мальцев С. В., Буланович Ю. А., Гончарова Н. И., Данильченко Н. В., Марченко В. Ю., Суслопаров И. М., Рыжиков А. Б. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКТА КЛУБНЕЙ ЦИКЛАМЕНА ЕВРОПЕЙСКОГО В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА ТРИВАЛЕНТНОЙ ГРИПОЗНОЙ ВАКЦИНЫ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ МОРСКИХ СВИНОК	154

Дерюшева И. В., Ибрагимова М. К., Цыганов М. М. ИНТЕГРАТИВНАЯ И ЭПИСОМАЛЬНАЯ ФОРМЫ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16 ГЕНОТИПА В ИЗМЕНЕННОМ ЦЕРВИКАЛЬНОМ ЭПИТЕЛИИ 159

Зыбкина А. В., Полежаева О. А., Щербаков Д. Н. ИНДУКЦИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА γ , ПРОТИВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКИХ ЛИХОРАДОК 163

Ибрагимова М. К., Дерюшева И. В., Небова Ю. А., Цыганов М. М. БЕЗРЕЦИДИВНАЯ И ОБЩАЯ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫМ И ВПЧ-НЕГАТИВНЫМ РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ..... 166

Қалқожаева М. Қ., Сактаганов Н. Т., Баймухаметов А. М., Кливлеева Н. Г. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НА ГРИПП ПОПУЛЯЦИИ СВИНЕЙ В КОСТАНАЙСКОЙ ОБЛАСТИ КАЗАХСТАНА В 2018 Г. 170

Касымбеков Е. Т., Карамендин К. О., Кыдырманов А. И., Саятов М. Х., Даулбаева К. Д., Хан Е. Я., Сулейменова С. А. ПОЛНОГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ВИРУСА БОЛЕЗНИ НЬЮКАСЛА, ИЗОЛИРОВАННОГО ОТ СИЗОГО ГОЛУБЯ В ЮЖНОМ КАЗАХСТАНЕ В 2015 ГОДУ 172

Кольцова Г. С., Титов И. А., Малоголовкин А. С. РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВИРУС АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНА *EP402R* 176

Кривошеина Е. И., Кузнецов А. И., Карташов М. Ю., Микрюкова Т. П., Акимова А. С. ПОИСК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА 4 И 5 ГЕНОТИПОВ В КЛЕЩАХ, СНЯТЫХ С ЛЮДЕЙ В НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ В 2017 ГОДУ 179

Максименко Л. В., Тотменин А. В., Скударнов С. Е., Ященко С. В., Гашикова Н. М. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ВИЧ-1 В КРАСНОЯРСКОМ КРАЕ: ГОРЯЧАЯ ТЕРРИТОРИЯ РЕКОМБИНАЦИИ ВИРУСА 183

Марченко В. Ю., Колосова Н. П., Гончарова Н. И., Суслопаров И. М., Гудымо А. С., Святченко С. В., Гаврилова Е. В., Максютков Р. А., Рыжиков А. Б. ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ВЫСОКОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ ГРИППА H5NХ, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ 187

Мима К. А., Кольцова Г. С., Каторкин С. А., Малооголовкин А. С. РЕКОМБИНАЦИОННАЯ КАССЕТА ДЛЯ СОЗДАНИЯ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНОВ MGF110.....	190
Морозова Д. Ю., Иматдинов А. Р., Середа А. Д. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ	192
Никитенко Н. А., Гейсман А. Н., Мельникова В. Е., Лысенко К. Н., Тухватулин А. И., Озеров А. А., Новиков М. С., Логунов Д. Ю. ПРОИЗВОДНЫЕ 2-ТИОУРАЦИЛА — ИНГИБИТОРЫ РЕПЛИКАЦИИ АДЕНОВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА	196
Онхонова Г. С., Марченко В. Ю., Святченко С. В., Рыжиков А. Б. РЕЦЕПТОРНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА А/Н3N2 И А/Н9N2, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В 2017–2018 ГГ. В РОССИИ.....	199
Петрова П. А., Коновалова Н. И., Даниленко Д. М., Васильева А. Д., Еропкин М. Ю. ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н3N2), ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В РОССИИ В ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2017–2018 ГГ.....	203
Садуакасова М. А., Султанов А. А., Банковска К. Б. РАЗРАБОТКА СПЕЦИФИЧНЫХ РЕАЛ-ТАЙМ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ СЕРОТИПА ВИРУСА ЯЩУРА ASIA1	206
Святченко С. В., Дурыманов А. Г., Колосова Н. П., Швалов А. Н., Гончарова Н. И., Суслопаров И. М., Гудымо А. С., Марченко В. Ю., Трегубчак Т. В., Рыжиков А. Б., Ильичева Т. Н. ПОЯВЛЕНИЕ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ НЕЙРАМИНИДАЗОЙ, ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ СЕЗОННЫХ ШТАММОВ А(Н3N2) В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ MDCK	208
Сулейменова С. А., Жуматов К. Х., Кыдырманов А. И., Карамендин К. О., Хан Е. Я., Касымбеков Е. Т., Даулбаева К. Д., Саятов М. Х. ФИЛОГЕНЕЗ ГЕНОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА И НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ШТАММА ВИРУСА ГРИППА А (Н5N1), ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ЧАЙКИ В КАЗАХСТАНЕ В 2015 Г.....	213

Усольцева П. С., Резайкин А. В., Новоселов А. В. МЕХАНИЗМЫ СЕЛЕКЦИИ ВИРУСА ЕСНО11 ПРИ АДАПТАЦИИ К КУЛЬТУРАМ КЛЕТОК RD И Л-41 КД/84.....	217
Фофанов М. В., Клопотова М. Р., Козлова Ю. Н., Тикунов А. Ю., Морозова В. В. АНАЛИЗ ГЕНОМОВ БАКТЕРИОФАГОВ, ИНФИЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИИ РОДА <i>KLEBSIELLA</i>	221
Хан Е. Я., Кыдырманов А. И., Карамендин К. О., Даулбаева К. Д., Асанова С. Е., Касымбеков Е. Т., Сейдалиева А. Б., Сулейменова С. А., Жуматов К. Х., Саятов М. Х. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ ГЕМАГГЛЮТИНИНА И НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А/ФАЗАН/БАЛХАШ/6218/14 (H1N1).....	225
Хомколова В. В., Аникина А. Ю., Тотменин А. В., Бекболотов А. А., Кадырбеков У. К., Гашников Н. М. ИССЛЕДОВАНИЕ ВИЧ-1 СРЕДИ ЛИЦ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ В РЕСПУБЛИКЕ КЫРГЫЗСТАН, ВЫЯВИЛО ЗНАЧИМЫЕ ТЕРРИТОРИАЛЬНЫЕ ОТЛИЧИЯ	228

РАЗДЕЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Андреева Е. А., Хонина Н. А., Баторов Е. В., Пасман Н. М., Черных Е. Р. МИКРОВЕЗИКУЛЫ В ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТИ У ЖЕНЩИН В ПРОГРАММЕ ЭКО	232
Аулова К. С., Невинский Г. А. ИММУНИЗАЦИЯ РАЗЛИЧНЫМИ АНТИГЕНАМИ И ОБРАЗОВАНИЕ АНТИТЕЛ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АУТОИММУННОМ ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТЕ МЫШЕЙ.....	239
Бабич В. О., Марков А. В., Саломатина О. В., Салахутдинов Н. Ф., Зенкова М. А., Логашенко Е. Б. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ, НЕСУЩИХ ЦИАНО-ЕНОНОВЫЙ ФАРМАКОФОР	242
Балыбина Н. Ю., Яковлева Т. В., Макарова Е. Н., Бажан Н. М. ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ОТВЕТ БУРОГО ЖИРА НА ОЖИРЕНИЕ, ИНДУЦИРОВАННОЕ ДИЕТОЙ, У САМЦОВ И САМОК МЫШЕЙ.....	246

Балык К. В., Сухарева Е. В., Ланшаков Д. А., Калинина Т. С. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СЕРТОНИНОВОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА ВЗРОСЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ НЕОНАТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ И ДЕЙСТВИЯ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА.....	250
Батлук У. И., Бурдеева К. В., Шулюпова А. С., Бондарь Н. П. ОТСТАВЛЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ НЕОНАТАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА: НАРУШЕНИЕ КОГНИТИВНЫХ СПОСОБНОСТЕЙ ВЗРОСЛЫХ САМЦОВ МЫШЕЙ И ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ГИППОКАМПЕ	253
Болдырева Д. С., Кечин А. А., Макарова М. А., Кафтырева Л. А., Щербак С. Г., Апалько С. В., Филипенко М. Л., Сарана А. М., Чурина М. А. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ЭНТЕРОАГРЕГАТИВНЫХ <i>E. COLI</i> ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ	255
Гайнутдинов П. И., Слепнева А. В., Курская О. Г., Кожин П. М., Ковнер А. В. АКТИВАЦИЯ МИКРОГЛИИ КОРЫ НА ФОНЕ ИНФИЦИРОВАНИЯ НЕ НЕЙТРОПНЫМ ВИРУСОМ ГРИППА А(Н1N1) А/ TOMSK/13/2010	258
Гладышева А. В., Терновой В. А., Пономарева Е. П., Микрюкова Т. П., Протопопова Е. В., Швалов А. Н., Коновалова С. Н., Чаусов Е. В., Локтев В. Б. ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА К РАЗЛИЧНЫМ ВИДАМ ХОЗЯЕВ	262
Гринева Е. Н., Спасская Д. С., Карпов Д. С. СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ RPN4-ПОДОБНОГО БЕЛКА ИЗ <i>CANDIDA GLABRATA</i>	265
Дольский А. А. ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В РАЗВИТИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМОЙ.....	269
Дрозд У. С., Ланшаков Д. А., Дыгало Н. Н. ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА РАННЕГО ОТВЕТА C-FOS В НЕЙРОНАХ ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЫ И СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКИХ ЯДЕР СРЕДНЕГО МОЗГА ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ СУБАНАСТЕТИЧЕСКОЙ ДОЗЫ КЕТАМИНА В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО СТРЕССА.....	271

Дудко С. Г., Антонен Д. В., Карпенко Л. И., Бажан С. И. ИССЛЕДОВАНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ДНК-ВАКЦИННЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ, КОДИРУЮЩИМИ ИСКУССТВЕННЫЕ ПОЛИЭПИТОПНЫЕ ИММУНОГЕНЫ ВИРУСА ЭБОЛА.....	275
Дылева Ю. А., Синицкий М. Ю. ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА <i>ADIPOQ</i> В ОБРАЗЦАХ ЖИРОВОЙ ТКАНИ РАЗЛИЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА	279
Журавина М. А., Климов Л. О., Маркель А. Л. АНАЛИЗ УРОВНЯ РНК ГЕНОВ, СВЯЗАННЫХ С БИОСИНТЕЗОМ ОКСИДА АЗОТА, У КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИЕЙ (НИСАГ).....	283
Журавлев Е. С., Шендер В. О., Ануфриева К. С., Семенов Д. В., Рихтер В. А., Степанов Г. А. ПОЛНОТРАНСКРИПТОМНОЕ И ПРОТЕОМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АНАЛОГОВ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА	287
Запарина О. Г., Ковнер А. В., Рахметова А. Ш., Пахарукова М. Ю., Мордвинов В. А. ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПИСТОРХОЗЕ	292
Зырянова Д. П., Тотменин А. В., Богачева Н. В., Гашникова Н. М. ПОЛУЧЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КЛОНОВ CRF63_02A1 ВИЧ-1 С ТРОПИЗМОМ К CCR5 И CXCR4 КОРЕЦЕПТОРАМ	294
Ковалева Г. В. ПОИСК БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА TRIM14	297
Колхидова З. А., Кокаев Г. С., Хестанова Р. А. ВОЗМОЖНОСТИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ НЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННОЙ ПАТОЛОГИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ В СОХРАНЕНИИ КАЧЕСТВА ЗДОРОВЬЯ И ПРОФИЛАКТИКЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ	301

Коршунов А. С., Конев В. П. ИЗУЧЕНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА И ОРГАНИЧЕСКОГО МАТРИКСА ЭМАЛИ ЗУБОВ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ	306
Кулешова А. Е., Боярских У. А. РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ОПУХОЛЕВОЙ ДНК В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С РАКОМ ТОЛСТОЙ КИШКИ.....	311
Курусь Н. Н., Дульцев Ф. Н., Ломзов А. А., Шевелёв Г. Ю., Дюдеева Е. С., Пышный Д. В. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК/ДНК-КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ СПЕКТРОСКОПИИ	314
Марков А. В., Кель А. Э., Саломатина О. В., Салахутдинов Н. Ф., Зенкова М. А., Логашенко Е. Б. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКОГО ТРИТЕРПЕНОИДА СМ, НЕСУЩЕГО ЦИАНО-ЕНОНОВЫЙ ФАРМАКОФОР: <i>IN SILICO</i> АНАЛИЗ	318
Матвеева А. М., Филиппова Ю. А., Журавлев Е. С., Балахонова Е. А., Тимофеева М. М., Семенов Д. В., Степанов Г. А. РЕГУЛЯЦИЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ МАЛЫХ ЯДРЫШКОВЫХ РНК С ПРИМЕНЕНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ...	322
Матвиенко Д. А. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ (CAR), СПЕЦИФИЧНЫХ К БЕЛКАМ PSMA И PSCA.....	325
Мирошниченко С. К., Патутина О. А., Буракова Е. А., Сенькова А. В., Челобанов Б. П., Стеценко Д. А., Власов В. В., Зенкова М. А. N-МЕЗИЛ ФОСФОРАМИДНЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ЭФФЕКТИВНО ИНАКТИВИРУЮТ ОНКОГЕННУЮ МИКРОРНК-21 <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i> И ЯВЛЯЮТСЯ ДОСТОЙНОЙ АЛЬТЕРНАТИВОЙ ФОСФОТИОАТНЫМ АНАЛОГАМ	328
Можаева Е. В., Степанов Г. А., Журавлев Е. С., Семенов Д. В., Балахонова Е. А., Касакин М. Ф., Р. Шах Махмуд, Маланин С. Ю., Григорьева Т. Ю., Сергеева М. В., Комиссаров А. Б. 293FT — МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ГРИППА А	331

Мунгалов Р. В., Фишман В. С., Хабарова А. А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМЫ CRE/LOXP ДЛЯ ИНДУКЦИИ МНОЖЕСТВЕННЫХ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК В ГЕНОМЕ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА.....	335
Некрасова Е. В., Никитин А. А., Шавва В. С., Орлов С. В. АПОЛИПОПРОТЕИН А-1 В МАКРОФАГАХ ЧЕЛОВЕКА УЧАСТВУЕТ В ЗАХВАТЕ АЦЕТИЛИРОВАННЫХ ЛИПОПРОТЕИНОВ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ	339
Павлова А. С., Купрюшкин М. С. ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ К САМОАССОЦИИ ДОДЕЦИЛ-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ	341
Плеканчук В. С., Латышева Т. В., Прокудина О. И., Алехина Т. А., Рязанова М. А. ЭКСПРЕССИЯ МРНК ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ СИСТЕМЫ КАТЕХОЛАМИНОВ, УРОВЕНЬ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В ПОЛОСАТОМ ТЕЛЕ, СРЕДНЕМ И ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГЕ И РЕАКЦИЯ ПРЕСТИМУЛЬНОГО ТОРМОЖЕНИЯ У КРЫС С ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КАТАТОНИЕЙ	343
Полежаева О. А., Щербаков Д. Н., Зыбкина А. В. ИММУНОГЛОБУЛИНЫ КЛАССА γ, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ВИРУС МАРБУРГ	347
Полуконова А. В., Дидыч Д. А., Свердлов Е. Д. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ СТРОМА-АССОЦИИРОВАННЫХ ГЕНОВ В АЛЛОГРАФТНЫХ МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ МЫШИ.....	350
Пурвиньш Я. В., Грищенко И. В. СОЗДАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МОДЕЛИ (ЦГТ)N ПОВТОРА И ЕЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРИ АКТИВНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ.....	353
Риттер Г. С., Николин В. П., Попова Н. А., Кисаретова П. Э., Долгова Е. В., Проскурина А. С., Поттер Е. А., Кирикович С. С., Байбородин С. И., Таранов О. С., Ефремов Я. Р., Колчанов Н. А., Богачев С. С. НОВЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ РАДИОПРОТЕКТОРОВ.....	355

Рудометов А. П., Андреева Н. Б., Щербаков Д. Н., Бакулина А. Ю., Чикаев А. Н., Каплина О. Н., Карпенко Л. И. ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ИММУНОГЕНОВ, НЕСУЩИХ ЭПИТОПЫ, УЗНАВАЕМЫЕ ШИРОКОНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ ВИЧ-1 АНТИТЕЛАМИ	359
Савиновская Ю. И., Савельева А. В., Нуштаева А. А., Морозов В. В., Кулигина Е. В., Рихтер В. А., Семенов Д. В. ВЛИЯНИЕ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ ЧАСТИЦ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА — ЭКЗОСОМ И МИКРОВЕЗИКУЛ НА КЛЕТКИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ A549	362
Сомов А. К., Тугутова Е. А., Проскура К. В., Тамкович С. Н., Юнусова Н. В., Стахеева М. Н., Лактионов П. П. ПРОТЕАЗЫ ЭКЗОСОМ КРОВИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	365
Старостина Е. В., Федотова С. А., Дудко С. Г., Антонен Д. В., Каплина О. Н., Карпенко Л. И., Бажан С. И. ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДНК-ВАКЦИННЫХ КОНСТРУКЦИЙ, КОДИРУЮЩИХ КОНСЕРВАТИВНЫЕ ФРАГМЕНТЫ СТЕБЛЯ ГЕМАГГЛЮТИНИНА И БЕЛОК M2 ВИРУСА ГРИППА.....	369
Субботина К. В. ПОИСК МУТАЦИЙ В ГЕНАХ LEP И MC4R У ПАЦИЕНТОВ С МОРБИДНЫМ ОЖИРЕНИЕМ	372
Суворов Г. К., Кожевникова О. С., Телегина Д. В. ГИБЕЛЬ КЛЕТОК В ПРЕФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ И СЕТЧАТКЕ КРЫС OXYS НА СТАДИИ, ПРЕДШЕСТВУЮЩЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМ ИЗМЕНЕНИЯМ.....	375
Сухарева Е. В., Ланшаков Д. А., Калинина Т. С., Булыгина В. В., Дыгало Н. Н. РОЛЬ БЕЛКОВ AP-1 КОМПЛЕКСА В ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗЫ	379
Тараскин А. С., Протасов А. В., Клотченко С. А., Миргородская О. А. ПРИЛОЖЕНИЕ МЕТОДА MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ МАРКЕРОВ СИСТЕМНОГО ВОСПАЛЕНИЯ И СЕПСИСА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА	382

Хабардина Е. А., Новопашина Д. С., Вохтанцев И. П., Жарков Д. О., Венямина А. Г. ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ РНК ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА	387
Чепанова А. А., Захаренко А. Л., Захарова О. Д., Ильина Е. С., Хоменко Т. М., Можайцев Е. С., Суслов Е. В., Ли-Жуланов Н. С., Филимонов А. С., Лузина О. А., Волчо К. П., Салахутдинов Н. Ф., Лаврик О. И. РАЗРАБОТКА ИНГИБИТОРОВ TDP1, ОСНОВАННЫХ НА ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЯХ	391
Чэн С., Марков А. В., Саломатина О. В., Салахутдинов Н. Ф., Зенкова М. А., Логашенко Е. Б. ВВЕДЕНИЕ ГЕТАРИЛЬНЫХ ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В СТРУКТУРУ ГЛИЦИРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ УСИЛИВАЕТ ЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ	395
Шабурова Е. В., Ланшаков Д. А., Калинина Т. С., Дыгало Н. Н. ЭФФЕКТЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА ЭКСПРЕССИЮ НЕЙРОТРОФИНОВ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ В ОБЛАСТЯХ НЕОНАТАЛЬНОГО ГОЛОВНОГО МОЗГА С МОНОАМИНЕРГИЧЕСКОЙ ИННЕРВАЦИЕЙ	399
Шавва В. С., Некрасова Е. В., Орлов С. В. ИНСУЛИН ПОДАВЛЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА СЗ В ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КЛЕТКАХ ЛИНИИ NERG2 ЧЕРЕЗ АКТИВАЦИЮ PPARγ	403

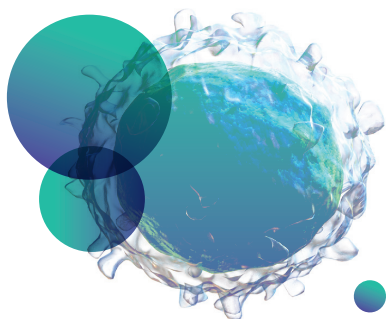
Научное издание

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

Сборник тезисов

Верстка *А. С. Терешкиной*

Подписано в печать 08.10.2018 г.
Формат 60 × 84 1/16. Уч.-изд. л. 26,6. Усл. печ. л. 24,7.
Тираж 150 экз. Заказ № 228.
Издательско-полиграфический центр НГУ
630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2.



Biotech Innovation Global

BIOCAD — международная инновационная биотехнологическая компания, объединяющая научно-исследовательский центр мирового уровня, современное фармацевтическое производство, доклинические и клинические исследования

Компания производит препараты, предназначенные для лечения самых сложных заболеваний, таких как рак, ВИЧ, гепатит, рассеянный склероз и т.д.



Более **45** продуктов
в портфеле, из них
10 биологические



Более **40** препаратов
в разработке



26 лабораторий



8 зарубежных офисов
4 производственные
площадки



1700 сотрудников,
52 % — научные
сотрудники



32 года — средний
возраст сотрудников

Миссия нашей компании

Улучшение и продление
жизни людей посредством
предоставления
эффективных, безопасных
и доступных комплексных
решений в области наук
о жизни.

BIOCAD сотрудничает с ведущими вузами страны и запускает собственные образовательные проекты

BIOCAD поддерживает молодых и перспективных студентов, развивая собственные программы для них.

- Факультет и магистерская программа на базе ПуцГЕНИ – Молекулярная генетика и клеточная биотехнология (2017)
- Магистерская программа на базе СПХФУ – Биомедицина и биоинженерия (2018)
- Магистерская программа на базе МФТИ – Математическая биология (2018)

BIOCAD
Biotechnology Company

Tofflon

Expertise in Pharmaceutical Industry

Решение для Биоинженерии



Фокус

Биотехнологии, биофармацевтика

Область применения

Антитела, рекомбинированные белки, вакцины, биологические продукты и продукты на основе плазмы крови

Продукты

Культивация:

> Ферментер > Биореактор

Очистка:

> Тангенциальная фильтрация потока > Хроматографические системы > Колонны

Вспомогательные системы:

> Подготовка и хранение сред > Системы непрерывной деактивации отходов
> Подготовка и хранение буферов > In-line разбавление
> Технологические сосуды

Сервис:

> Интегрированные решения > Разработка биотехнологических процессов

Помимо проведения собственных научных исследований, Tofflon привлекает глобальные ресурсы для обеспечения заказчиков оптимизированными системными решениями. Tofflon предоставляет готовые решения, включая биотехнологическое оборудование и системы начиная от подготовки питательных сред, культивации и сбора микроорганизмов, очистки и приготовления буферов до финального розлива.

www.tofflon.com