

ЮБИЛЕЙНАЯ 25-АЯ ПУЩИНСКАЯ
ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
СБОРНИК ТЕЗИСОВ

25
БИОЛОГИЯ
НАУКА XXI ВЕКА



УДК 576:577:579:574
ББК 28.7 + 28.4
С23

С23 Сборник тезисов 25-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА».
Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2022. – 379 с.

ISBN 978-5-91874-907-4

С 18 по 22 апреля в г. Пушкино проходила юбилейная 25-ая Пушкинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». На конференции были рассмотрены новейшие достижения и результаты исследований молодых ученых, специализирующихся в различных областях биологической науки. Были проведены мастер-классы и пленарные лекции ведущих ученых. В сборнике представлены тезисы 370 докладов участников конференции по следующим направлениям:

- микробиология и вирусология;
- биофизика и биоинформатика;
- молекулярная биология;
- биохимия;
- экология;
- почвоведение;
- биофармацевтика;
- биотехнология;
- физиология животных и фундаментальная биомедицина;
- физиология растений и фотобиология.

Публикуется в авторской редакции

УДК 576:577:579:574
ББК 28.7 + 28.4

Сборник издан при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках проекта Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1051).

ISBN 978-5-91874-907-4

© Коллектив авторов
© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|----------------------------------------------|------------|
| МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ | 4 |
| БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА | 56 |
| МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ | 96 |
| БИОХИМИЯ | 164 |
| ЭКОЛОГИЯ | 185 |
| ПОЧВОВЕДЕНИЕ | 207 |
| БИОФАРМАЦЕВТИКА | 214 |
| БИОТЕХНОЛОГИЯ | 251 |
| ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ | |
| БИОМЕДИЦИНА | 287 |
| ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ФОТОБИОЛОГИЯ | 352 |
| АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ | 367 |



МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

ASPERGILLUS NIGER AM1 – МИКРООРГАНИЗМ, ЭВОЛЮЦИОННО АДАПТИРОВАННЫЙ К УСЛОВИЯМ ДЕФИЦИТА ФОСФОРА

Акосах Йав Абайе¹, Миндубаев А.З.², Бабынин Э.В.³

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия;

³Татарский НИИ агрохимии и почвоведения ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

mindubaev-az@yandex.ru

Эволюционная история выделенного из технического белого фосфора штамма *Aspergillus niger* воспроизведена при помощи метода UPGMA. Для сравнения использовались представленные в базе штаммы *A. niger*, выделенные в разных странах мира. Результаты свидетельствуют, что в наибольшем родстве со штаммом AM1 состоят штаммы *A. niger* NJDL-12 и *A. niger* FP1 из Китая, которые способны к растворению фосфатных минералов. Они имеют 64% сходства по гену ITS.

Внешние группы – штаммы других видов: *Aspergillus fumigatus* и *A. bombycis* (они выполняют роль контролей). Обосновано предположение, что штаммы из одного кластера могут быть сходны по характеристикам. Такие свойства черных аспергиллов, как патогенность или накопление микотоксинов, четко связаны с принадлежностью штамма к определенным кластерам. А оно имеет прямое отношение к практическому применению культур микроорганизмов. Чем больше мы знаем об этих плесневых грибах, тем лучше будем понимать результаты данного анализа.

Таким образом, можно предполагать, что штамм AM1 относится к кластеру, эволюционно возникшему на территории Китая и специализировавшемуся на биодеструкции фосфорных соединений. Возможно, белый фосфор, из которого он выделен, был доставлен в нашу страну из Китая – крупнейшего производителя этого сырья – и штамм завезен вместе с ним.

Для того, чтобы подтвердить родство с известными солубилизаторами фосфатов, мы исследовали способность *Aspergillus niger* AM1 метаболизировать ортофосфат кальция – наиболее распространенную форму фосфора в природе, но при этом малодоступную для живых организмов. Оказалось, что штамм потребляет нерастворимый фосфат так же легко, как растворимые фосфаты, входящие в состав культуральных сред. То есть, действительно является солубилизатором фосфата, как следует из теоретических результатов анализа базы NCBI. Возможно, именно эволюционная адаптация к нехватке доступного фосфора стала причиной способности микроорганизма потреблять целый ряд биологически недоступных форм данного элемента.

Можно предполагать, что исследуемый аспергилл является специализированным организмом, эволюционно приспособленным к существованию в условиях дефицита биодоступного фосфора. Этим объясняется его способность перерабатывать труднодоступные источники фосфора, включая даже элементный фосфор.



ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИИ РОДА *EVANSELLA*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ТЕХНОГЕННОГО ВОДОЕМА (г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Алеев В.С.^{1,2}, Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия;

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН
– филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

v1.vvv132@yandex.ru

Алкалофильные и галофильные/галотолерантные микроорганизмы являются приоритетным объектом исследований ввиду их способности адаптироваться к широкому диапазону солености и щелочным условиям среды. Ферменты этой группы бактерий используются в целлюлозно-бумажной промышленности (ксиланазы), при производстве моющих средств (протеазы и целлюлазы), а также в пищевой промышленности и медицине.

Цель работы – характеристика бактерий рода *Evansella*, выделенных из техногенного щелочного водоема, расположенного на территории Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС) (Пермский край).

Представители рода *Evansella* были выделены из образцов донных отложений техногенного щелочного водоема, отобранных с глубины 0,16-1,88 метров. В образцах выявлено значение pH 10,32-11,55, концентрация органического вещества 3,07-4,23%, содержание Na⁺ 9785-39078 мг/кг, K⁺ 289-29447 мг/кг; Mg²⁺ 3-4510 мг/кг. Выделение микроорганизмов проводили методом накопительного культивирования в среде Пфеннига (100 г/л NaCl) с добавлением бикарбонатно-карбонатного буфера (pH=9,5). Дальнейшие культивирования бактерий осуществляли на среде Пфеннига (pH 9-11, NaCl 0-200 г/л) и богатой среде Раймонда (pH 7, NaCl 50 г/л).

Из образцов выделено 4 штамма, которые по морфологическим и генетическим характеристикам были отнесены к бактериям рода *Evansella* (класс *Bacilli*, порядок *Caryophanales*, семейство *Bacillaceae*). Три штамма, обозначенных CX2-1, CX2-6, CX3-18, имели 100% сходство по гену 16S рРНК с *E. clarkii* DSM 8720^T и *E. polygoni* YN-1^T. Штамм CX3-5 имел сходство с *E. cellulositytica* DSM 2522^T на уровне 98,35%.

Исследуемые штаммы являются алкалофильными, галотолерантными бактериями, способными расти при pH 7-11. Штаммы CX2-1 и CX3-18 демонстрировали способность расти на средах как без соли, так и с содержанием NaCl до 200 г/л. Оптимальные характеристики роста штаммов наблюдались при pH 10 и 50 г/л NaCl. Штаммы CX2-6 и CX3-5 росли при концентрации NaCl до 100 г/л. Для типовых штаммов рода не описаны способности к росту на нейтральной pH и концентрации NaCl более 200 г/л, которые продемонстрировали исследуемые штаммы.

Изолированные экстремофильные штаммы рода *Evansella* представляют интерес для дальнейших исследований. Следует отметить, что штамм *Evansella* sp. CX3-5 имеет низкий процент сходства по генам 16S рРНК с типовыми штаммами рода и, в перспективе, может быть описан как новый таксон.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.



ИЗМЕНЧИВОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВИРУСОВ ГРИППА H1N1PDM09 РАЗНЫХ ЛЕТ ВЫДЕЛЕНИЯ

Аль Фаррух М.^{1,2}, Баженова Е.А.¹, Киселева И.В.¹, Пучкова Л.В.¹

¹ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

²Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Институт биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

mouhammad1farroukh@gmail.com

До настоящего времени невозможно предсказать, когда возникнет новая пандемия гриппа. Это делает исследования эволюционной изменчивости вирусов гриппа актуальными и важными. В настоящем исследовании мы сконцентрировали наше внимание на эволюции некоторых основных биологических свойств вируса гриппа A(H1N1)pdm09, а именно, на его токсичности для лабораторных животных, способности к репликации за верхними пределами температурного оптимума (*non-ts* фенотип) и стабильности НА, а также вклада каждого из этих признаков в проявление вирусом патогенности для мышей; кроме того, мы попытались объяснить взаимосвязь между этими свойствами вируса.

Материалы и методы. В работе использовали 21 вирус гриппа A(H1N1)pdm09, выделенных с 2009 по 2021 год. *Non-ts* фенотип оценивали по соотношению титров вируса в куриных эмбрионах при 40°C и 32°C. За *non-ts* фенотип принимали соотношение 60% и выше. Термическая стабильность НА. Вирусы инкубировали в термоблоке для инактивации НА в течение 20 минут при температурах от 37 до 70°C, после чего ставили стандартную реакцию гемагглютинации с куриными эритроцитами. Считали, что НА обладает низкой стабильностью, если вирус теряет гемагглютинирующую активность при температурах ниже 58°C.

Мыши. 880 самок мышей линии СВА (питомник «Рапполово»). Токсичность для мышей. Мышей заражали интраназально неразведенной аллантаоисной вирусосодержащей жидкостью вируса. За высокотоксичные вирусы принимали штаммы, вызывающие 50%-ю и более гибель от острого отека легких в течение первых 5-6 дней после заражения.

Патогенность для мышей. Мышей заражали интраназально 10-кратными разведениями вирусосодержащей аллантаоисной жидкости. Летальность мышей от вирусной пневмонии учитывали в течение 14 дней после заражения. За высокопатогенные для мышей вирусы принимали штаммы, у которых ЛД₅₀ превышала 4 lg.

Результаты и обсуждение. Из 21 вируса 18 имели *non-ts* фенотип, 11 были высокотоксичными, 9 имели высокостабильный НА, и только один (A/South Africa/3626/2013) оказался высокопатогенным для мышей. Была установлена связь между определенными свойствами вируса гриппа. Так, чтобы вирус был токсичным для мышей или проявлял высокую стабильность НА, он должен иметь *non-ts* фенотип, а для того, чтобы быть высокопатогенным, необходимо обладать всеми тремя ранее упомянутыми характеристиками.

Закключение. *Non-ts* фенотип, термостабильность НА и токсичность для мышей являются незаменимыми свойствами вируса гриппа и играют ключевую роль в его патогенности.



ПОИСК ФАГОВЫХ БЕЛКОВ, ТОКСИЧНЫХ ДЛЯ КЛЕТОК
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Антонова Д.А., Ничипоренко А.С., Якунина М.В.

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

nasada12@mail.ru

Одной из основных проблем современности является возникновение у бактерий устойчивости к известным антибиотикам. Поиск новых антибиотиков является трудоемкой и дорогостоящей задачей. В связи с этим возрос интерес к использованию в медицине бактериофагов – естественных врагов бактерий. Бактериофаг *phiKZ* инфицирует *P. aeruginosa*, вызывающую нозокомиальные инфекции и часто устойчивую к сразу нескольким классам антибиотиков. Вскоре после впрыскивания фаговой ДНК *phiKZ* в клетку рост и деление бактериальной клетки останавливается. Вероятно, что остановку деления вызывают белки бактериофага, появляющиеся в начале инфекции. Исследование воздействия этих белков на бактериальные клетки поможет выявить новые бактериальные мишени для воздействия антибиотиков, а также использовать выявленные токсичные белки непосредственно в качестве антибактериального агента.

В рамках представляемой работы было проанализировано действие 6 ранних белков. Для этого гены *gp005*, *gp006*, *gp007*, *gp008*, *gp010* и *gp011* вставлялись в вектор *pHERD20T* под арабинозный промотор. Клетки *P. aeruginosa* штамма PAO1, содержащие сконструированные плазмиды, помещали в лунки планшета для последующей детекции оптической плотности клеток в планшетном спектрофотометре с присутствием 1% арабинозы в питательной среде. В качестве контроля использовались клетки с пустым вектором *pHERD20T* как с добавлением индуктора, так и без него, а также клетки с полученными генетическими конструкциями без добавления арабинозы. Каждый образец был представлен тремя биологическими повторами. Съёмка велась раз в 5 минут в течение минимум 8 часов при 37 °С.

Эксперименты показали, что динамика роста клеток с экспериментальными плазмидами, в среде без арабинозы незначительно отличалась от контрольных клеток, содержащих пустой вектор. В то же время клетки, синтезирующие ранние белки, отличались от контрольных клеток. Большинство исследуемых ранних белков значительно снижали скорость деления клеток (*Gp005*, *Gp006*, *Gp008*), два ранних белка, по-видимому, остановили деление клеток (*Gp010*, *Gp011*). В дальнейшем планируется определение мишени и механизма воздействия ранних белков *Gp010* и *Gp011*.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы «Приоритет 2030» (соглашение 075-15-2021-1333 от 30.09.2021).



ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ХИМИЧЕСКОГО И ЗЕЛЕННОГО СИНТЕЗА, НА ПАРАМЕТРЫ РОСТА *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Арутюнян А.А., Агаджанян А.А., Габриелян Л.С.

Ереванский Государственный Университет, Ереван, Республика Армения

aniharutyunyan@ysu.am

Pseudomonas aeruginosa является возбудителем нозокомиальных инфекций человека и обладает резистентностью к ряду антибиотиков. В настоящее время разрабатываются различные подходы к преодолению антибиотикорезистентности. Решением этой проблемы может стать использование наночастиц (НЧ) серебра.

В ходе данной работы исследовано влияние НЧ серебра, полученных путем химического и зеленого синтеза на параметры роста *P. aeruginosa* Gar 3 (Центр депонирования микроорганизмов НАН РА, Ереван, Армения). Зеленые НЧ серебра были получены из биомассы цианобактерии *Spirulina platensis*.

S. platensis широко используется в биотехнологии, фармацевтике, пищевой промышленности, является источником ценного белка, незаменимых аминокислот, жирных кислот, витаминов, микроэлементов, и может служить платформой для биосинтеза наночастиц. НЧ серебра, полученные как путем химического, так и зеленого синтеза, демонстрировали зависящее от концентрации подавляющее действие на *P. aeruginosa*, выражающееся в снижении удельной скорости роста бактерий и количества жизнеспособных колоний. Добавление 20-30 мкг/мл химических и зеленых НЧ серебра приводило к снижению скорости роста бактерии в 6-7 раз. Кроме этого, количество жизнеспособных колоний *P. aeruginosa*, выросших на твердой питательной среде, понижалось примерно на 60%, по сравнению с контролем, что свидетельствует о бактерицидном действии данных НЧ. Таким образом, как химические НЧ серебра, так и полученные путем зеленого синтеза, в малых дозах проявляли значительную антибактериальную активность в отношении условно-патогенного штамма *P. aeruginosa*, и могут быть использованы в биомедицине для лечения различных инфекций, вызванных данной бактерией. При этом, использование НЧ серебра, полученных из биомассы цианобактерии, более целесообразно, так как зеленый синтез НЧ является экономически более перспективным и экологически чистым способом получения наночастиц.

СРАВНЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОТКРЫТОГО ПРИРОДНОГО ВОДОЁМА, И ЛАБОРАТОРНЫХ ШТАММОВ *E. COLI*

Бардак М.В., Будагова Т.Ю., Самков А.А., Худокормов А.А., Волченко Н.Н.

ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

maria.brd1405@mail.ru

Развитие резистентности микроорганизмов к антибиотикам является актуальной проблемой нашего времени. Своевременная оценка исходной чувствительности штаммов, выделенных из природной среды, может позволить избежать широкого распространения устойчивости микроорганизмов к различным группам антибиотиков.



Объектами исследования являлись девять штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из открытого природного водоема в г. Краснодаре. В ходе эксперимента проводилось сравнение с контрольной группой, представленной семью лабораторными коллекционными штаммами семейства *Enterobacteriaceae*, характеризующимися устойчивостью к антибиотикам. Антибиотикорезистентность штаммов изучалась при помощи диффузионного дискового метода, а также на питательной среде Эндо с добавлением разных концентраций антибиотиков: стрептомицина, эритромицина, ампициллина, рифампицина, канамицина.

Было установлено, что штаммы, выделенные из природной среды, обладали меньшей устойчивостью к антибиотикам, нежели контрольная группа. Процентная доля устойчивых ко всем использованным антибиотикам суммарно составила 57 и 71 процент соответственно. Максимальную устойчивость микроорганизмы проявили к ампициллину – доля составила 95 и 92 процентов для вновь выделенных и длительно поддерживаемых лабораторных штаммов соответственно. Было обнаружено значительное превышение доли устойчивых лабораторных штаммов для таких антибиотиков, как рифампицин, эритромицин и стрептомицин (на 43, 29 и 18 процентов соответственно) над вновь выделенными. Процентное соотношение резистентных штаммов семейства *Enterobacteriaceae* для вновь выделенных штаммов было распределено следующим образом: стрептомицин – 61%, эритромицин – 50%, рифампицин – 50%, канамицин – 28%. Доля устойчивых к канамицину штаммов на 14 процентов превысила значения устойчивости штаммов контрольной группы, что могло свидетельствовать о росте резистентности к канамицину у штаммов, выделенных из природной среды.

Таким образом, сопоставление антибиотикорезистентности штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из открытого природного водоема, и лабораторных показало доминирование доли резистентных к использованным антибиотикам у вторых. У микроорганизмов, выделенных из природной среды, наблюдалась повышенная устойчивость к ампициллину, а также к канамицину, вследствие чего можно предположить о широком распространении генов устойчивости микроорганизмов к данным антибиотикам в исследуемом водоеме.

ИЗУЧЕНИЕ ОПАСНЫХ ВИРУСОВ И ФИТОПЛАЗМ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Башкирова И.Г.^{1,2}, Шнейдер Ю.А.¹, Каримова Е.В.¹, Хорина Н.А.³

¹ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, Раменское, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия;

³Приморский филиал ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»,
Владивосток, Россия

bashkirova@mail.ru

Картофель является важной сельскохозяйственной культурой в Российской Федерации. Площадь выращивания картофеля в 2021 году составила 274 тыс. га, согласно маркетинговым исследованиям экспертно-аналитического центра агробизнеса «АБ-Центр». Качество семенного и продовольственного картофеля может снижаться из-за поражения многими фитопатогенными микроорганизмами, в том числе вирусами, виридами и фитоплазмами.



При импорте картофеля существует риск распространения фитопатогенов, отсутствующих или ограниченно распространенных на территории Российской Федерации, таких как вирусы картофеля A (PVA), M (PVM), S (PVS), X (PVX), Y (PVY), скручиваемости листьев (PLRV) и фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani*, *Ca. Phytoplasma asteris*, которые инфицируют растения картофеля. Заражение растений данными микроорганизмами ежегодно приводят к значительным экономическим потерям (снижение урожая до 70-100%).

Своевременная диагностика опасных вирусов, виридов и фитоплазм с помощью точных и чувствительных методов молекулярной диагностики позволят предотвратить распространение фитопатогенов на территории Российской Федерации. Поэтому, изучение биологических и молекулярных особенностей данных фитопатогенов является актуальной задачей для оптимизации существующих и разработки новых методов идентификации вредных микроорганизмов в подкарантинной продукции при проведении лабораторной диагностики.

В ходе нашей работы была проведена оценка методов выявления и идентификации фитопатогенов картофеля. Для отработки методов ПЦР использовали референтные изоляты различных штаммов вирусов (PVA PV-0760; PVM PV-0273; PVS PV-0740; PVX PV-0014; PVY PV-0321 и др.), полученные из коллекции DSMZ (Германия), а также ДНК исследуемых видов фитоплазм из коллекции ФГБУ «ВНИИКР».

Результаты проведенных исследований по изучению особо опасных вирусов и фитоплазм картофеля с помощью молекулярно-генетических методов легли в основу методических рекомендаций ФГБУ «ВНИИКР» по их выявлению и идентификации.

ИЗУЧЕНИЕ РАННЕГО ОТВЕТА АЭРОБНО РАСТУЩИХ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Габова А.О.¹, Тюленев А.В.², Октябрьский О.Н.²

¹ФГАОУ ВО «Пермский национальный исследовательский политехнический университет»,
Пермь, Россия;

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

ms.anya.05@mail.ru

Окислительный стресс является результатом воздействия активных форм кислорода (АФК) на живые организмы. В ходе эволюции бактерии выработали защитные механизмы, позволяющие адаптироваться к различным типам стресса, в том числе к пероксидному стрессу. В этой работе показано, что ответ на окислительный стресс начинается уже в первые секунды после воздействия АФК, о чем свидетельствуют изменения таких важных физиологических параметров, как удельная скорость роста, дыхательная активность и трансмембранная циркуляция ионов.

Использовали бактерии *Escherichia coli* BW25113 (родительский штамм) из коллекции Keio. Бактерии выращивали на среде M9 с глюкозой в аэробных условиях при 37°C. Исследование проводили в середине экспоненциальной фазы роста. Измерение оптической плотности, расчет удельной скорости роста и способность к образованию колоний (КОЕ) проводили традиционными методами. Непрерывную и синхронную регистрацию изменений



физиологических параметров растущих культур *E. coli* проводили с применением электрохимических сенсоров, установленных непосредственно в колбы с культурами бактерий, что позволило оценить быстрые изменения при стрессе без отбора проб. Парциальное давление кислорода (pO_2) и чувствительную регистрацию pH осуществляли на модифицированном контроллере BioFlo 110 (NBS, USA). Уровни экстраклеточного сульфид-иона определяли ионоселективным сенсором XC-S²⁻-001 (Sensor Systems, РФ), экстраклеточных ионов калия – K⁺-селективным сенсором ELIS-121K («ИТ», РФ). Концентрацию GSH измеряли с использованием модифицированного метода Титца.

При действии H₂O₂ на растущие *E. coli* наблюдалось резкое обратимое повышение pO_2 в среде, вызванное деструкцией H₂O₂ эндогенными каталазами. При низких концентрациях H₂O₂ отмечалось обратимое падение скорости роста, что сопровождалось увеличением экстра- и внутриклеточного GSH и повышением продукции S²⁻, что могло быть связано с нарушением гомеостаза цистеина. Обработка высокими дозами оксиданта (10 mM) приводила к полному ингибированию роста и снижению КОЕ. Одновременно наблюдался выход части K⁺ в среду, что могло указывать на падение мембранного потенциала у части клеток в культуре.

Таким образом, удалось выявить тесную связь между такими параметрами как удельная скорость роста, выживаемость, дыхательная активность, продукция S²⁻, а также способностью к поддержанию градиента ионов K⁺ при раннем ответе на окислительный стресс.

Работа выполнена в рамках Государственного задания АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке Гранта РФФИ 19-44-590009.

ВЛИЯНИЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ТИПА С НА РОСТ БИНАРНЫХ БИОПЛЕНОК *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ATCC14990 И *CUTIBACTERIUM ACNES* RT5

Овчарова М.А., Гераскина О.В., Мартьянов С.В., Плакунов В.К., Ганнесен А.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

masha_ovcharova_97@mail.ru

Staphylococcus epidermidis и *Cutibacterium acnes* являются одними из наиболее распространенных бактерий-комменсалов кожи человека и во многом определяют ее состояние и гомеостаз, находясь в составе мультивидовых биопленок в различных микронизах, таких как полости желез и волосяных фолликулов. В последние годы все больший интерес вызывает взаимодействие микробиоты человека с его регуляторными системами и, в частности, потенциальное регулирование микробного сообщества на коже человека. Мы обнаружили, что натрийуретический пептид С-типа (НУП-С) действует как регулятор бактериального сообщества *S. epidermidis* ATCC14990 и *C. acnes* RT5, позволяя *C. acnes* лучше расти в присутствии *S. epidermidis* (доля *C. acnes* составила, 0.33% в контроле и 1.9%, при добавлении гормона), которые является доминирующей частью микробного сообщества. Показано, что НУП-С действует в основном на биопленки и в меньшей степени на планктонные культуры, что свидетельствует о потенциальной связи между биопленками как формой существования бактерий в кожных железах и фолликулах и регуляторными системами человека. Слабое влияние на планктонные культуры лучше наблюдается в



кинетических экспериментах с планшетным спектрофотометром и в основном проявляется в начале кривой роста без влияния на конечный объем биомассы. В бинарных биопленках метаболическая активность ОП₅₄₀ в присутствии НУП-С падает с 4.3 ± 0.4 в контроле до 2.6 ± 0.54 в присутствии гормона.

Воздействие НУП-С на биопленки, по-видимому, является комплексным, направленным на глобальные процессы в клетках, поскольку действие гормона не зависит от типа поверхности, на которой выращивали биопленки и оказывает ингибирующий эффект (гидрофобный тефлон или гидрофильное стекло). Также, НУП-С потенциально влияет на экспрессию генов в бинарных биопленках и обладает ингибирующим эффектом на ряд ключевых генов (в частности на субъединицу L НАДН-оксидоредуктазы, белок L28 50S-субъединицы рибосом L28 и белок S14 30S-субъединицы рибосом).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-10071.

СОЗДАНИЕ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* С ДЕЛЕЦИЯМИ ГЕНОВ *SLMA*, *MINC*, *TOLC*

Голофеева Д.М.¹, Румянцева Н.А.¹, Вишняков И.Е.², Ведяйкин А.Д.¹

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

golofeevad@gmail.com

Деление бактериальной клетки (цитокнез) – сложный согласованный во времени и пространстве процесс, управляемый молекулярной машиной, называемой дивисомой. Несмотря на активное изучение, в настоящее время остаётся множество пробелов в понимании механизмов цитокнеза. Для большинства бактерий главным компонентом дивисомы, который запускает процесс деления и управляет им, является белок FtsZ.

В представленной работе были осуществлены делеции генов *slmA*, *minC* и *tolC* в штамме *Escherichia coli*, продуцирующем белок FtsZ, который слит с флуоресцентным белком mNeonGreen, двумя различными методами. Данный штамм удобен для визуализации Z-кольца – структуры, формируемой в клетке белком FtsZ. Полученные в результате выполнения работы штаммы $\Delta slmA$, $\Delta tolC$ и $\Delta minC$ помогут в дальнейшем выяснить особенности регуляции процесса деления бактериальной клетки в условиях SOS-ответа.

Штаммы $\Delta slmA$ и $\Delta tolC$ были получены при помощи системы λ Red (метод К. Даценко). Белок SlmA предотвращает сборку Z-кольца над хромосомой, являясь важным компонентом нуклеоидной окклюзии – одной из 2 важнейших систем пространственной регуляции деления. Отсутствие данного белка позволит выяснить влияние данной системы на процесс деления при SOS-ответе. Отсутствие эффлюксной помпы TolC в клетке позволит легче визуализировать ДНК в процессе деления.

При создании мутации $\Delta minC$ любые осуществлённые модификации протоколов с применением системы λ Red оказались неэффективны и не позволили получить штамм с такой мутацией, поэтому в итоге данная делеция была получена при помощи P1-трансдукции. Min-



система – ещё одна важная система пространственной регуляции деления, которая принимает участие в позиционировании Z-кольца. Создание данной делеции оказалось наиболее трудным, вероятно, в силу большой роли белка MinC в жизненном цикле бактерии. Делеция *minC* в штамме *Escherichia coli*, с генома которого экспрессируется рекомбинантный белок FtsZ:mNeonGreen, привела к более существенному изменению фенотипа клеток относительно донорного штамма из Keio-коллекции.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ в рамках научного проекта № 22-24-00085.

УЧАСТИЕ ГЕНА *MBNL1* В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ЭХОВИРУСОВ И КОКСАКИВИРУСОВ А

**Гробушкин П.А.^{1,2}, Кущенко А.С.^{1,3}, Красота А.Ю.^{1,4}, Гладнева Е.Е.^{3,4}, Ивин Ю.Ю.⁴,
Калинина Н.О.^{1,5}, Агол В.И.¹, Дмитриев С.Е.^{1,3}**

¹НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского – Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Кафедра молекулярной биологии, биологический факультет, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁴ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических
препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Москва, Россия;

⁵Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, Россия

sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru

Эховирусы и коксакивирусы – (+)РНК-содержащие вирусы, вызывающие различные заболевания человека [1]. Как и другие пикорнавирусы, для трансляции своих мРНК они используют участки внутренней посадки рибосом (IRES) [2]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе работы этих элементов, изучены недостаточно. Чтобы найти человеческие гены, участвующие в жизненном цикле эховирусов, мы провели нокаутрующий CRISPR/Cas-скрининг на устойчивость культивируемых клеток НЕК293Т к цитопатической инфекции, вызываемой вирусами Echo6, Echo11, Echo19 и Echo30. Мы идентифицировали *MBNL1* (Muscleblind Like Splicing Regulator 1) – ген, кодирующий РНК-связывающий белок, участвующий в альтернативном сплайсинге мРНК, – как необходимый для цитопатической инфекции. Белок *MBNL1* является партнером другого регулятора сплайсинга, РТВР1 [3], который хорошо известен как транс-действующий фактор, необходимый для работы IRES (ITAF) ряда пикорнавирусов [2]. Мы предположили, что *MBNL1* также является ITAF. Была приготовлена моноклональная клеточная линия с нокаутом (КО) гена *MBNL1*, которая была инфицирована различными энтеровирусами. Эховирусы Echo6, Echo7, Echo14, Echo19 и Echo30, а также вирусы Коксаки СVA16 и СVA9 показали задержку гибели клеток *MBNL1* КО на 3-4 дня по сравнению с клетками НЕК293Т дикого типа, в то время как СVA9 вообще не оказывал цитопатического действия на клетки КО. Напротив, на динамику гибели клеток, зараженных коксакивирусами CVB3, CVB4 и



CVB5 и полиовирусами PV1, PV2 и PV3, отсутствие MBNL1 влияния не оказывало. Значение MBNL1 для IRES-опосредованной трансляции энтеровирусов исследовали с помощью репортерных конструкций в клетках, трансфицированных мРНК, и в бесклеточной системе. Будут представлены данные о его роли в жизненном цикле вирусов. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00178).

Литература.

1. Lee et al. (2010) J. Clin. Virol. 49, 175-179.
2. Sorokin et al. (2021) Biochemistry (Moscow) 86, 1060–1094.
3. Gooding et al. (2013) Nucleic Acids Res. 41, 4765–4782.

ВЛИЯНИЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА ТИПА А НА МОНОВИДОВЫЕ И БИНАРНЫЕ БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 209P И *KYTOCOCCUS SCHROETERI* H01

**Дювенжи Е.В.¹, Неволлина Е.Д.¹, Мартьянов С.В.¹, Калмантаева О.В.², Макарова М.А.²,
Журина М.В.¹, Бочкова Е.А.¹, Фирстова В.В.², Плакунов В.К.¹**

¹ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Москва, Россия;

²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
Оболенск, Россия

ekaterina.dyvenji@gmail.com

Микробиота кожи представляет собой сложное сообщество микроорганизмов, которая играет важную роль в функционировании кожного покрова, иммунной системы человека и тесным образом связана с системами гуморальной регуляции. Все больше данных говорит о том, что регуляторные соединения организма человека, не обладающие прямым антимикробным действием, способны оказывать влияние на рост, вирулентность и образование биопленок бактерий, в связи с чем данное направление исследований является крайне актуально для таких областей как косметология и дерматология.

В нашей работе мы рассмотрели влияние натрийуретического пептида типа А (НУПА) на моновидовые и бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* и *Kytococcus schroeteri*. Было обнаружено, что НУПА способен изменять свойства клеточной поверхности и процессы агрегации в биопленках. НУПА увеличивал гидрофильные свойства клеток *S. aureus*, что выражалось в снижении сродства клеток к гидрофобному растворителю – гексадекану (НУПА – 28,2%; контроль – 47,1%). Было показано, что НУПА снижал агрегацию в моновидовых биопленках *S. aureus*, выращенных в системе, где рост биопленок происходил в равновесии с планктонной культурой (НУПА – 37,6%; контроль – 23,3%). Также, было продемонстрировано, что НУПА ингибировал рост *S. aureus* в составе бинарной биопленки, что выражалось в снижении агрегационной способности и снижении объема биопленок, исследованных с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. В системе, где рост биопленок происходил без равновесия с планктонной культурой количество и размер агрегатов в бинарной биопленке *K. schroeteri* и *S. aureus* в присутствии НУПА увеличивалось до 68,8% и 5,5 клеток, соответственно (контроль – 54,2% и 3,3).



Таким образом, полученные данные позволяют расширить наше понимание о взаимодействии организма человека с его микробиотой, а также позволит найти новые подходы к лечению и поддержанию микробного баланса кожи.

Работа была выполнена при финансовой поддержке проекта РНФ № 19-74-10071.

ПОТЕНЦИАЛ ШТАММА BS3701 *PSEUDOMONAS PUTIDA* КАК РЕЗЕРВУАРА ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБИТИКАМ ГРУППЫ БЕТА-ЛАКТАМОВ

Загоскин А.А.¹, Нагорных М.О.^{1,2}, Захарова М.В.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушчино, Россия;

²АНО ВО «Университет «Сириус», пгт. Сириус, Россия

zagoskin.alecksandr@yandex.ru

Введение. Множественная резистентность бактерий к антибиотикам является актуальной проблемой современности. Это явление обусловлено различными факторами в том числе обеспечивается за счёт механизма горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам между различными видами бактерий. Одним из лидеров по устойчивости среди клинических патогенов является *Pseudomonas aeruginosa*. И возникает вопрос, а могут ли другие представители семейства *Pseudomonas* в частности штамм BS3701 выступать в качестве поставщиков генов устойчивости для клинических штаммов? Необходимо учитывать повсеместное распространение представителей этого семейства и их использование в деятельности человека.

Цель. Оценить потенциал штамма BS3701 *Pseudomonas putida* как резервуар генов устойчивости к антибиотикам группы бета-лактамов.

Методы. Культивирование клеточной культуры BS3701 осуществляли с использованием планшетного спектрофотометра SPECTROstar Nano (MBG). Культивирование осуществлялось при 30°C с постоянным помешиванием в объёме 500 мл в течение 12 часов. При культивировании использовали минимальную среду M9. В каждую лунку добавляли ампициллин различной конечной концентрацией от 0,625 до 6,25 нг/мкл с шагом в 0,625 нг/мкл. qPCR проводили с использованием набора для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол). Обсчёт результатов проводили с использованием программы Excel. Гомологию оценивали с использованием интернет-ресурсов NCBI и Clustal Omega.

Результаты и обсуждение. При добавлении ампициллина с конечной концентрацией 0,625 нг/мкл наблюдалось отклонение кривой роста, а при конечной концентрации ампициллина 6,25 нг/мкл рост ингибировался полностью. Исследование методом qPCR показала отсутствие повышения уровня экспрессии генов металл зависимых бета-лактамаз под давлением антибиотика. Построение филогенетического дерева, опираясь на аминокислотную последовательность этих генов показала отсутствие значительного родства между бета-лактамазами BS3701 и металл зависимыми бета-лактамазами других представителей рода *Pseudomonas*.



Выводы. Опираясь на полученные данные можно заключить что штамм BS3701 не обладает выраженной устойчивостью к бета-лактамам. Анализ гомологии выявил низкую степень идентичности белков металл зависимых бета-лактамаз BS3701 относительно других представителей семейства *Pseudomonas*. Можно утверждать, что BS3701 не выступает в качестве резервуара генов устойчивости к антибиотикам и его можно и в дальнейшем использовать в прикладных задачах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСЕРВАТИВНОСТИ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК, УЧАСТВУЮЩИХ В РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА АЗОТА, В ГЕНОМЕ *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS3701

Иванова Е.В.^{1,2}, Позднякова-Филатова И.Ю.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пущино, Россия;

²ФГБОУ ВО Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия

ivanova05evgenia99@yandex.ru

Штамм *Pseudomonas putida* BS3701 (NZ_CP059052.1), содержит гены деструкции нафталина. В условиях дефицита азота количества мРНК этих генов значительно увеличивается. Однако в области upstream у них не обнаружено сайта связывания NtrC, а механизм регуляции процесса пока неясен. В связи с этим было сделано предположение о влиянии некодирующих РНК (далее – нкРНК) на эти гены. Затем был проведен поиск нкРНК, участвующих в регуляции метаболизма азота и последующее определение их консервативности.

В качестве целевых РНК были выбраны малые некодирующие регуляторные РНК, предсказанные с помощью программ prokka 1.14.6 и PresRAT. В области upstream этих РНК с помощью программы Sigmoid был обнаружен NtrC-зависимый энхансер, а с помощью iPro54-PseKNC σ^{54} – зависимый промотор. В геноме *Pseudomonas putida* BS3701 было обнаружено 24 нкРНК имеющих NtrC-зависимый энхансер и σ^{54} – зависимый промотор. У генов находящихся upstream и downstream от отобраным некодирующих РНК с помощью сайта SyntTax был проведен поиск синтенных блоков и определение консервативных локусов.

В итоге было обнаружено 6 предполагаемых нкРНК, которые расположены в консервативных для рода *Pseudomonas* локусах: нкРНК длиной 179 н., расположенная между регулятором транскрипции NtrC и гипотетическим белком; нкРНК длиной 76 н., расположенная между предполагаемым регулятором транскрипции PdtaR и нитрат транспортером NasA; нкРНК длиной 73 н., расположенная между предполагаемым регулятором транскрипции PdtaR и нитрат транспортером NasA; нкРНК длиной 134 н., расположенная между сигма-фактором RpoS и белком ферредоксином FdxA; нкРНК длиной 186 н., расположенная между гипотетическим белком и белком GspE системы секреции АТФазы 2 типа; нкРНК длиной 56 н., расположенная между гипотетическим белком и белком YgfZ тРНК; нкРНК длиной 300 н., расположенная между регулятором транскрипции NtrC и гипотетическим белком.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01138, <https://rscf.ru/project/22-24-01138/>



ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА БИОРАЗНООБРАЗИЯ ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ В ЭКОСИСТЕМЕ ОЗЕРА БАЙКАЛ

**Имидова Н.А., Переляева Е.В., Дмитриева М.Е.,
Бельшенко А.Ю., Аксёнов-Грибанов Д.В.**

ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

natasha-imideva@rambler.ru

Исследования возможности микроорганизмов осуществлять процессы биологической деструкции веществ различного происхождения имеют особую актуальность и прикладную значимость. Особое значение для таких исследований представляют бактерии – обитатели древних экосистем, таких как озеро Байкал. Поскольку экосистема озера характеризуется прежде всего низкой температурой воды, микроорганизмы, адаптировавшиеся к таким условиям, являются психрофильными и могут выступать в качестве возможного источника уникальных ферментов биологической деструкции с высокой стабильностью и низким температурным оптимумом.

Целью данного исследования являлась первичная оценка биоразнообразия культивируемых психрофильных бактерий озера Байкал, участвующих в процессах деструкции материалов, содержащих лигноцеллюлозу.

В ходе работ проведено выделение психрофильных бактерий-деструкторов с поверхности отходов лесопиления, погруженных в озеро Байкал. Полученные пробы были посеяны газонем на 4 различных по составу питательные среды, в том числе на среду Гетчинсона – специфическую питательную среду для целлюлозоразрушающих бактерий. Выделение чистых культур бактерий происходило в условиях холодильной камеры при температуре +5 °С. Так, было выделено 338 бактериальных культур, 128 из которых выделены с питательной среды Гетчинсона, что говорит о том, что данные бактерии, по-видимому, являются психрофильными бактериями-деструкторами. Идентификацию штаммов проводили посредством амплификации гена 16S рНК. Обнаружены представители как широко распространенных родов, *Pseudomonas* sp. и *Arthrobacter* sp., так и представители редких родов *Janthinobacterium* sp., *Cryobacterium* sp., *Pseudarthrobacter* sp., *Pseudoclavibacter* sp. Проанализировав литературные данные, установлено, что представители родов *Janthinobacterium*, *Cryobacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Arthrobacter*, *Pseudoclavibacter* упоминаются в единичных исследованиях, проводимых в экосистеме оз. Байкал. Половина идентифицированных штаммов не являются распространенными для озера Байкал. Показано, что данные микроорганизмы представляют большую ценность для биотехнологических разработок и открытия новых ферментов и природных соединений с биологической активностью.

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно – образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал) и Гранта Президента РФ (МК-1245.2021.1.4).



ВЛИЯНИЕ ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ И УСЛОВИЙ АЭРАЦИИ НА БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Калашникова Т.В., Тюленев А.В., Смирнова Г.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

tatyana-kalashnikova22@yandex.ru

Бактериальные биопленки обладают большей устойчивостью к антимикробным препаратам и стрессовым факторам по сравнению с планктонными клетками, благодаря чему формирование таких сообществ является одной из стратегий выживания бактерий, что вызывает серьезные медицинские и технические проблемы. На ранних стадиях биопленкообразования одним из факторов, влияющих на развитие биопленки, является взаимодействие клеток с поверхностью. Целью работы являлось изучение влияния площади поверхности и условий аэрации на биопленкообразование бактерий *Escherichia coli*.

В качестве объекта исследования использовался родительский штамм *E. coli* BW25113 (wt) из коллекции Keio. Культуру бактерий выращивали на минимальной среде MOPS с добавлением 4 мМ фосфата и глюкозы (4 г/л). Ночную культуру центрифугировали, ресуспендировали в свежей среде до OD_{600} 0.07 и переносили в 96-, 24-, 12- и 6-луночные полистирольные планшеты с ячейками объемом 0.2, 2, 4 и 8 мл соответственно. Дальнейшую инкубацию проводили в статических условиях при 37°C в течение 22 часов. Для определения влияния условий аэрации культивирование проводили в нескольких режимах: 1 – в стационарном термостате 22 ч.; 2 – со встряхиванием планшета 330 об/мин 2 ч при 37°C и последующей инкубацией; 3 – с предварительной адаптацией культуры к аэробным условиям во встряхиваемой колбе 2 ч при 37°C; 4 – с адаптацией культуры в колбе и встряхиванием в планшете. Количество биопленок определяли путем окрашивания прикрепленных клеток генцианвиолетом, измеряя OD_{540} на микропланшетном спектрофотометре.

Удельное биопленкообразование (SBF) в 24-, 12- и 6-луночных планшетах было в 8-10 раз ниже по сравнению с массой биопленки в 96-луночных планшетах. Предположительно, такие результаты могут быть связаны с разницей отношения площади поверхности лунки (S) к объему добавляемой пробы (V). В планшетах с большим объемом меньше S/V, что может вызывать трудности прикрепления планктонных клеток к стенкам планшетов. Увеличение площади поверхности в 2-2.5 раза за счет сеток, помещаемых на дно 12- и 6-луночных планшетов, приводило к повышению SBF в 3.5 раза.

Изучение влияния условий аэрации показало, что масса биопленки в режиме предварительного встряхивания планшетов была в 5-7 раз меньше, чем в условиях, когда культивирование проводилось сразу в статическом режиме. При этом предварительная адаптация культуры к аэробным условиям в колбе в течение 2 ч не оказывала существенного влияния на биопленкообразование.

Работа выполнена в соответствии с государственным заданием АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке гранта РФФИ-Урал № 19-44-590009.



СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТЕАЗЫ PS273R ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Калинин Д.С.^{1,2}, Майоров С.Г.¹, Латыпов О.Р.¹, Грановский И.Э.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия;

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

309163@gmail.com

Африканская чума свиней АЧС представляет собой тяжелое и зачастую смертельное заболевание, поражающее домашних свиней и кабанов. Её распространение приводит с серьезным экономическим последствиями в странах с неблагоприятной эпизоотической обстановкой. Возбудителем заболевания является вирус африканской чумы свиней.

Протеаза pS273R является существенной для созревания ко́ра и инфекционности вируса. Она участвует в процессинге двух вирусных полибелков pp220 и pp62, продукты протеолиза которых служат основными компонентами внутреннего капсида вируса и составляют около 32% от общей массы вириона. Это свидетельствует о высокой активности протеазы в инфицированных клетках.

Целью нашей работы стала разработка метода получения активной вирусной протеазы pS273R.

Была создана плазмидная конструкция pSlyD-S273R, кодирующая вирусную протеазу pS273R, слитую на N-конце с шапероном SlyDi полигистидиновой последовательностью. Продукцию химерной протеазы pS273R проводили в штамме *E. Coli* Rosetta(DE3). Были отработаны оптимальные условия культивирования культуры – температура и время инкубации, а также концентрация индуктора. Анализ показал, что протеаза pS273R накапливается в растворимой фракции клеток, при этом происходит автокаталитическое отщепление протеазы от белка-шаперона.

Была отработана схемы выделения и очистки протеазы pS273R вируса АЧС. Вирусная протеаза, содержащаяся в осветленном клеточном лизате, последовательно очищается в три этапа: на анионообменной смоле, катионообменном сорбенте, а также с использованием гидрофобного сорбента. Альтернативой последней стадии является использование металл-хелатной хроматографии. Как было отмечено ранее, расщепление гибридного белка происходит непосредственно в бактериальных клетках, нерасщепленные гибридные белки преимущественно остаются в осадке после разрушения клеточной биомассы, что выигрышно помогает устранить заведомо неправильно уложенные формы белка.

Из 1 литра культуры в лабораторных условиях нами было получено 10 г. влажной биомассы. В результате был разработан подход для получения вирусной протеазы pS273R с чистотой не менее 98,5%, с выходом не менее 10 мг целевого пептида из 1 л культуральной жидкости.

Поскольку протеаза pS273R играет решающую роль в жизненном цикле вируса АЧС, она представляет собой привлекательную терапевтическую мишень. Разработанный нами способ получения этого фермента может способствовать проведению исследований в данном направлении.



ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РИНОВИРУСОВ НА ТЕРРИТОРИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА

**Ксенафонтов А.Д.¹, Писарева М.М.¹, Едер В.А.¹, Мусаева Т.Д.¹, Фадеев А.В.¹,
Тимофеева М.М.², Некрасов П.А.¹, Киселева И.В.³**

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²ООО Биолабмикс, Новосибирск, Россия;

³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

ksenandrey@yandex.ru

Риновирuses являются одними из самых распространённых респираторных вирусов. Риновирuses относятся к семейству *Picornoviridae*, роду *Enterovirus* и делятся на три вида – А, В, и С. Это безоболочечные, сферические вирусы, с икосаэдрическим капсидом. Диаметр вирусов составляет около 30 нм. Капсид состоит из четырёх капсидных протеинов. VP1, VP2, VP3 представлены на клеточной поверхности, в то время как VP4 располагается под капсидом. Геном – одноцепочечная РНК + размером 7,2 kb. Вирусный геном состоит из 5' конца, 5'VPg, нетранслируемой последовательностью 5'UTR, длинной открытой рамкой считывания, кодирующая полипротеин, 3'UTR и заканчивается 3' poly-A хвостом. Поскольку на три вида приходится более 150 типов, генетическое разнообразие риновирусов слабо изучено.

Исследования проводились на базе лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» МЗ РФ. Образцы (мазки из носо- и ротоглотки) поступали из СПб ГБУЗ КИБ им. С.П. Боткина, СПб ГБУЗ «ДГБ Св. Ольги», ДГКБ № 5 им. Н.Ф. Филатова, Санкт-Петербург. Детекция риновирусов осуществлялась методом ПЦР в режиме реального времени при помощи коммерческих наборов «АмплиСенс® ОРВИ-скрин-FL» (производство ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Исследование генетического разнообразия риновирусов осуществлялось путём секвенирования по методу Сэнгера с использованием праймеров, разработанных da Costa Souza *et al.* (2021).

За период с декабря 2020 года по октябрь 2021 года типировано 70 риновирусов. Самым распространённым оказался вид HRV-A (38/70 риновирусов, 54%). В равном количестве обнаружены HRV-B и HRV-C (по 16 риновирусов, 23% каждый). Был обнаружен 21 тип HRV-A, наиболее распространённым оказался HRV-A46 (9/21 риновирусов, 24%). HRV-B – 8 типов, самый распространённый – HRV-B06 (4/16 риновирусов, 25%). HRV-C – 8 типов, самые распространённые – HRV-C11, HRV-C32 и HRV-C15 (по 3/16 риновируса каждый, по 19%).

Из полученных данных видно, что генетическое разнообразие риновирусов очень высоко. В свою очередь это затрудняет как создание риновирусной вакцины, так и глубокие генетические исследования. Однако исследовать риновирусы необходимо, поскольку они продолжали активно циркулировать в период пандемии COVID-19. Кроме того, заболевание риновирусной инфекцией могут привести к серьёзным осложнениям, например, к астме.



ПОИСК ВЕЩЕСТВ, ВОЗДЕЙСТВУЮЩИХ НА БЕЛКИ, ОТВЕЧАЮЩИЕ ЗА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЁНОК В *ESCHERICHIA COLI*

**Ларичева И.И.¹, Ахалкаци А.Т.¹, Кузнецова У.Д.¹, Магкаев А.Т.¹,
Шатрова А.А.¹, Тутукина М.Н.²**

¹ГБОУ школа имени Маршала В.И. Чуйкова, Москва, Россия;

²АНОО ВО Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

ilari4eva@yandex.ru

Биопленки представляют собой популяцию клеток, заключенных в экзополисахаридный матрикс. Их, как известно, трудно искоренить, и они являются источником многих опасных инфекций. Природа резистентности бактериальных биопленок к антимикробным препаратам является важной проблемой. На данный момент используется сахар D-манноза, который может предотвращать адгезию патогенных бактерий (таких как *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterococcus*, *Streptococcus spp*) к эндотелию, но не может предотвращать образование биопленок. Именно поэтому понимание процессов их образования могло бы помочь в создании новых противобактериальных лекарств с более высокой эффективностью.

Цель работы – выяснить, какие белки влияют на образование биопленок найти вещества, блокирующие деятельность этих белков.

В ходе исследования мы работали со следующими факторами транскрипции, потенциально регулирующими образование бактериальных биопленок: cAMP-CRP, Fis, Fur, UxuR, ExuR, YjjM (LgoR), Dps, H-NS, IHF, CsqR (YihW), LeuO, GntR, FadR, CsgD, LacI, Lrp. Для визуализации белковых структур были использованы программы SWISS-MODEL, Phyre 2, AlphaFold. Некоторые молекулы требовалось стабилизировать, используя молекулярную динамику. При анализе были выявлены наиболее оптимальные варианты построения структур, которые в дальнейшем были использованы для молекулярного докинга.

Для оценки вовлеченности исследуемых белков в образование биопленок энтеропатогенными штаммами кишечной палочки (EPEC) и поиска мутаций было проведено выравнивание последовательностей белков, закодированных в геномах 51 штамма EPEC, с использованием программы MUSCLE. На основании выравниваний были построены филогенетические деревья с последующей визуализацией в Dendroscope. Проанализировав полученные данные, мы выяснили, что белки ExuR, CsgD, GntR, LeuO, Dps, YjjM, UxuR распадаются на клады, что, вероятно, отражает их способность влиять на образование биопленок. Поэтому мы выбрали эти белки для поиска низкомолекулярных веществ, модулирующих их ДНК-связывающую активность.

В будущем мы планируем провести докинг низкомолекулярных веществ – метаболитических интермедиатов и нейромедиаторов – на отобранные белки и проверить их влияние на формирование биопленок в лабораторных условиях. Это поможет нам найти вещества, блокирующие образование биопленок, и приблизиться к созданию комплексного средства для терапии вызываемых ими хронических заболеваний.

Авторы выражают благодарность О.О. Бочкаревой из IST Austria за предоставленные геномы EPEC.



ДЕСТРУКЦИЯ ФТАЛЕВОЙ И ТЕРЕФТАЛЕВЫХ КИСЛОТ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ РОДОВ *COMAMONAS*, *VARIOVORAX* И *PSEUDOMONAS*

Кулеш П.А.¹, Корсакова Е.С.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия;

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО
РАН, Пермь, Россия

polinapolliolog@gmail.com

В настоящее время фталаты, относящиеся к группе стойких органических загрязнителей и обладающие гепатотоксичными, тератогенными и канцерогенными свойствами, получили широкое применение в качестве пластификаторов, а также при синтезе полиэфирных волокон и полиэтилена. Наиболее удобным и рациональным методом разложения таких соединений считается биодеградация при использовании метаболического потенциала микроорганизмов. Данный метод требует гораздо меньше времени и финансовых затрат в сравнении с химическими и физическими методами.

Цель работы – изучение способности грамотрицательных бактерий родов *Pseudomonas*, *Comamonas* и *Variovorax* к деструкции фталевой и терефталевой кислот.

Из коллекции лаборатории микробиологии техногенных экосистем ИЭГМ УрО РАН были отобраны грамотрицательные штаммы бактерий, выделенные из промышленных стоков предприятия «СибурХимпром» г. Перми. Ряд бактериальных штаммов был проверен на рост в минеральной среде К1 с фталевой (ФК) и терефталевой (ТФК) кислотами в качестве субстрата и на основании полученных результатов отобраны 3 наиболее активных штамма-деструктора: *Pseudomonas* sp. IO14, *Comamonas* sp. SA47 и *Variovorax* sp. SO1.

Исследованы ростовые характеристики данных штаммов при росте на ФК и ТФК (1 г/л) при периодичном культивировании в минеральной среде К1 и утилизации этих субстратов. Показано, что наиболее высокие значения ростовых параметров ($OP_{600}=0,7$) и 100%-ная утилизация ТФК была зафиксирована у штамма *Pseudomonas* sp. IO14 через 22 часа, ФК – через 71 час. Максимальная удельная скорость роста (μ) при культивировании на ФК и ТФК была примерно одинакова ($\mu=0,108\pm 0,001 \text{ ч}^{-1}$).

Для штамма *Comamonas* sp. SA47 максимальные значения оптической плотности культуры ($OP_{600}=0,6$) и удельной скорости роста ($\mu=0,09\pm 0,0004 \text{ ч}^{-1}$) зарегистрированы к 29 часам культивирования на среде с добавлением ФК и к 71 часу ($OP_{600}=0,9$, $\mu=0,031\pm 0,002 \text{ ч}^{-1}$) с ТФК. Также установлена полная утилизация субстратов в среде.

Пик ростовых параметров ($OP_{600}=0,8$) и 100%-я утилизация субстрата для штамма *Variovorax* sp. SO1 зафиксированы через 25 часов культивирования на ФК (при $\mu=0,105\pm 0,0003 \text{ ч}^{-1}$) и через 47 часов – на ТФК (при $\mu=0,051\pm 0,001 \text{ ч}^{-1}$).

В результате проведенных исследования выявлены грамотрицательные штаммы бактерий, способные эффективно утилизировать фталаты (ФК, ТФК), и которые в перспективе могут быть использованы при разработке новых биотехнологий, связанных с ремедиацией и мониторингом загрязненных почв.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 19-44-590011р_а.



ЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ АКТИНОБАКТЕРИИ *CATENULOPLANES JAPONICUS*

Ларионова А.П., Трубицина Л.И., Трубицин И.В., Лисов А.В., Леонтьевский А.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушкино, Россия

larian-n@yandex.ru

В настоящее время ферментам находят применение в различных промышленных отраслях – пищевой, текстильной, в сельском хозяйстве, в медицине. Поэтому получение новых ферментных препаратов является актуальной задачей. Сейчас поиск генов, кодирующих биотехнологически-значимые ферменты, стал более простым благодаря открытому доступу (в научных базах данных) к большому количеству отсековированных геномов различных микроорганизмов.

Catenuloplanes – бактерии рода *Actinomyces*, на данный момент практически не исследованная группа микроорганизмов. В базе данных NCBI доступны геномные последовательности семи бактерий этого рода. Предварительный анализ геномов показал, что представители данной группы – носители литических ферментов, предположительно отвечающих за деградацию лигнина, ксилана, целлюлозы (ксиланазы и целлюлазы).

Для проведения работы нами был выбран штамм *Catenuloplanes japonicus* ВКМ Ас-875. Исследуемый актиномицет, согласно проведенному геномному анализу, содержал шесть генов целлюлаз и три гена ксиланаз. Данные гены были выбраны объектами исследования. Для амплификации целевых генов нами были разработаны праймеры. Благодаря оптимизации условий ПЦР-амплификации, были получены восемь ампликонов. Секвенированием была подтверждена амплификация пяти генов целлюлаз (WP_033337465.1, WP_198153691.1, WP_198153668.1, WP_033340972.1, WP_033344754.1) и трёх генов ксиланаз (WP_033342507.1, WP_033343690, WP_033344064.1). Затем были разработаны экспрессионные праймеры, позволяющие клонировать целевые гены в вектор pQE-30. Проведена амплификация генов с экспрессионными праймерами, обработка полученных ПЦР-ампликонов и экспрессионного вектора рестриктазами. После постановки реакции лигирования генов и экспрессионного вектора, мы провели ПЦР-проверку полученных трансформантов на наличие вставок при помощи ПЦР-амплификации. Были получены восемь генетических конструкций. Установлено, что при индукции трансформантов – носителей рекомбинантных генов ксиланаз и целлюлаз, наблюдалась повышенная продукция целлюлаз – WP_198153668.1 и WP_033340972.1, и ксиланазы WP_033344064.1.

Дальнейшая работа будет заключаться в оптимизации наработки трёх полученных рекомбинантных белков с целью их дальнейшей характеристики, а также в создании новых генетических конструкций для повышенной наработки «непроекспрессированных» целлюлаз и ксиланаз.



РОСТ БАКТЕРИЙ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5AP В СРЕДЕ С РАЗЛИЧНЫМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ НАФТАЛИНА

Ларченко А.Ю., Ковалёв Е.А., Мандрик М.И.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

larch.alina@gmail.com

Ароматические углеводороды в целом и полициклические ароматические углеводороды (такие как нафталин), в частности, являются распространенными и опасными (обладают канцерогенным и мутагенным действием) поллютантами, поступающими в окружающую среду из множества источников: разливы нефтепродуктов, неполное сгорание топлива, сжигание мусора, отходы химической промышленности и др. Наиболее безопасными, экономически выгодными (особенно при низкой степени загрязнения) являются биологические методы очистки с использованием бактерий-деструкторов. Особый интерес представляют микроорганизмы, способные утилизировать поллютанты в широких диапазонах концентраций.

Цель работы – изучить динамику роста и эффективность деградации нафталина бактериями *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap.

Динамику роста бактерий оценивали по оптической плотности ($\lambda = 600$ нм) и титру клеток. Концентрацию нафталина рассчитывали на основании показателей оптической плотности ($\lambda = 312$ нм) в соответствии с калибровочным графиком после экстракции перхлорэтиленом.

Изучение динамики роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap на минеральной среде с нафталином (в начальной концентрации 0,5 г/л и 10 г/л, что в 10 000 и 200 000 раз превышает ПДК в воде) позволило установить, что они характеризуются лаг-фазой, продолжительностью около 24 ч вне зависимости от концентрации нафталина. Однако продолжительность экспоненциальной фазы увеличивается в 3 раза при повышении концентрации: при концентрации 0,5 г/л занимает промежуток с 24 по 48 ч, а при концентрации 10 г/л с 24 по 96 ч. Соответственно, стационарная фаза наступает через 48 ч или 96 ч культивирования. Несмотря на то, что нафталин рассматривается как токсичное соединение, рост исследуемых бактерий стимулируется при повышении его концентрации: при концентрации нафталина 0,5 г/л максимальное значение титра клеток составляет $2,8 \times 10^8$ КОЕ/мл, а оптической плотности 7,4, тогда как при 10 г/л – $2,7 \times 10^9$ КОЕ/мл и 0,8, соответственно.

Эффективность деградации нафталина изучали при начальной концентрации 0,5 г/л. Через 24 ч концентрация нафталина практически не изменяется, что соответствует лаг-фазе, а через 48 ч убывает на 11,57% от исходной. Через 72 ч нафталин в среде культивирования не детектируется, т.е. наиболее активно процесс деградации нафталина происходит в стационарной фазе роста.

Таким образом, бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap могут быть использованы в качестве эффективных деструкторов нафталина, в частности в очистных установках предприятий по производству химической и коксохимической продукции, где нафталин выступает в качестве продукта или сырья.



КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК У НОНСЕНС-МУТАНТОВ SUP45 И SUP35 ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Леняшина М.О.¹, Максютенко Е.М.^{1,2}, Москаленко С.Е.^{1,2},
Барбитов Ю.А.¹, Журавлева Г.А.¹**

¹Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия;

²Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

st022640@student.spbu.ru

Введение. У дрожжей *S. cerevisiae* в процессе терминации трансляции участвуют два белковых фактора: eRF1 и eRF3. Эти белки кодируются жизненно важными генами *SUP45* и *SUP35*, соответственно. Ранее в нашей лаборатории были получены жизнеспособные нонсенс-мутанты *sup45* и *sup35*, механизмом выживания которых, вероятно, является увеличение количества копий мутантных аллелей этих генов. Известно, что нарушение терминации трансляции приводит к различным плеiotропным эффектам, в частности, дыхательной некомпетентности. В данной работе оценивали уровень митохондриальной ДНК (мтДНК) у нонсенс-мутантов по генам *SUP45* и *SUP35* по сравнению со штаммами дикого типа.

Материалы и методы. В нашей работе мы провели эксперименты по оценке копийности митохондриального гена *COX3* у мутантов *sup45* и *sup35* по сравнению со штаммами дикого типа. Для этого, на основе штаммов U-14-D1690 [*sup35Δ* pRS316-SUP35] и U-1A-D1628 [*sup45Δ* pRS316-SUP45], методом плазмидного шаффлинга были получены штаммы, содержащие плазмиды с мутантными аллелями генов *SUP35* и *SUP45*. Далее была выделена геномная ДНК из штаммов с аллелями дикого типа и мутантными аллелями и проведена серия количественных ПЦР в реальном времени для сравнения количества копий мтДНК.

Результаты. На основе полученных данных было обнаружено увеличение копийности митохондриального гена *COX3* в штаммах, содержащих плазмиды с нонсенс-мутантными аллелями генов *SUP35* и *SUP45*. Мы проанализировали корреляцию между результатами, полученными при оценке копийности центромерных плазмид и мтДНК в изучаемых штаммах. Статистический анализ показал высокую степень корреляции между изменениями числа копий плазмиды и мтДНК у разных мутантов *sup35* и *sup45*. Также было обнаружено, что клетки, содержащие плазмиды с нонсенс мутациями *sup35* и *sup45* характеризуются слабо выраженной дыхательной недостаточностью. Биоинформатический анализ последовательности митохондриального генома показал наличие структурных изменений в мтДНК клеток, несущих мутантные аллели *sup45-n*.

Заключение. Полученные результаты позволили выявить изменения в количестве мтДНК у мутантов *sup45* и *sup35*, что, вероятно, связано с адаптацией дрожжей к нарушению процесса терминации трансляции.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-14-00050 и выполнена в рамках гостемы № 0112-2016-0015.



ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ *RHODOBACTER CAPSULATUS*

Майорова Е.В., Петушкова Е.П.

Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушчино, Россия

ekaterina.majorova.97@mail.ru

Генетическая модификация пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* актуальна в связи со способностью данной бактерии к синтезу практически значимых соединений. Однако вследствие образования капсул, осуществление переноса целевой генетической конструкции может быть затруднено, а в некоторых случаях невозможно. Целью данной работы были поиск условий, в которых клетки *Rba. capsulatus* обладали минимальной капсулой, и оптимизация режима электропорации для переноса генетического материала. Изучены культуры *Rba. capsulatus* в разных условиях выращивания и фазах роста. Наличие или отсутствие капсул определяли по подвижности клеток в нативных препаратах. Клетки бактерии, окруженные капсулой, утрачивают способность к движению. Культивирование бактерий проводилось в фотогетеротрофных и темновых аэробных условиях. На богатых пептоно-дрожжевых средах (YPS и МРУЕ) при обычно используемой для получения компетентных клеток оптической плотности (0,4-0,8 ед. при 650 нм) процент подвижных клеток составлял 10-20 от общего числа. При увеличении засоленности среды в присутствии NaCl клетки образовывали длинные неподвижные цепочки, не расходясь после деления. На стандартной среде YPS число подвижных клеток увеличивалось с возрастом культуры и достигало 80% при ОП₆₅₀=1,8-2,7 ед. На минеральной среде с использованием 20 мМ лактата в качестве субстрата клетки приобретали подвижность в поздней стационарной фазе фототрофного роста. Подвижные короткие цепочки при новом пересеве на среду с лактатом быстро утрачивали способность к движению, образуя длинные нити уже при ОП₆₅₀=0,5-0,7 ед. Наиболее подходящей для получения подвижных клеток *Rba. capsulatus* в логарифмической фазе роста является минеральная среда с 20 мМ ацетата, причем именно при смене ростового субстрата с лактата на ацетат (при ОП₆₅₀=0,5-0,7 ед. число подвижных клеток составляет 80-90%), затем она снижается с возрастом культуры.

Изучена выживаемость полученных компетентных клеток *Rba. capsulatus* с капсулами и без, подвергнутых электропорации при различных режимах прибора, и оценена эффективность переноса в них плазмидной ДНК.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-14-00255.



РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ЖИЗНЕННО-ВАЖНЫХ ГЕНОВ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* С ПОМОЩЬЮ CRISPR/CAS9

Матвеевко А.Г., Михайличенко А.С., Зайцева Н.А., Журавлева Г.А.

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

a.matveenko@spbu.ru

Изучение функций жизненно-важных генов является сложной задачей для генетики микроорганизмов. Для таких исследований как правило используют жизнеспособных или условно-жизнеспособных мутантов, но в организмах, способных поддерживать плазмиды, возможно анализировать любые мутации или модификации жизненно-важных генов. Для этого существует методика «плазмидного шаффлинга», активно используемая в исследованиях дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Однако для использования этой методики необходимо сначала получить штамм, в котором единственная копия жизненно-важного гена поддерживается на плазмиде, а хромосомная копия полностью инактивирована. Классический способ получения таких штаммов весьма трудоёмок и занимает довольно длительное время, так как для этого сначала необходимо получить аутодиплоид из анализируемого нами штамма, затем нужно получить штамм, в котором активная и неактивная копия гена находятся в гетерозиготе, трансформировать этот штамм плазмидой, содержащей тот же самый ген, после чего провести споруляцию и отобрать только тех гаплоидных сегрегантов, которые несут данный ген на плазмиде, но не в хромосоме.

В последнее десятилетие бурно развиваются технологии редактирования генома, что во многом связано с открытием системы CRISPR/Cas9, позволяющей относительно легко осуществлять разрывы в ДНК с заданной последовательностью. В совокупности с высокой эффективностью гомологичной рекомбинации, использование системы CRISPR/Cas9 позволяет осуществлять самые разнообразные манипуляции с геномом дрожжей. Мы попробовали использовать эту систему для редактирования жизненно-важных генов, в частности, для их дизрупции в гаплоидных штаммах. Мы разработали векторы, позволяющие встраивать различные мишени в геномную РНК с помощью стандартных методов клонирования. С помощью полученных конструкций удавалось эффективно вносить мутации в жизненно-важный ген *SUP35*, однако все попытки осуществить дизрупцию гена *SUP35* оказались неудачными. Тогда мы воспользовались тем, что фактор элонгации трансляции eEF1A кодируется у дрожжей двумя генами, *TEF1* и *TEF2*, с идентичными кодирующими последовательностями, но различными промоторами и терминаторами. Нам удалось осуществить дизрупцию гена *TEF1*, который являлся жизненно-необходимым в штамме с дизрупцией гена *TEF2*, в присутствии *TEF2* на плазмиде. Таким образом получить дизрупцию жизненно-важного гена возможно, но при наличии плазмиды, в которой кодирующая последовательность этого гена фланкирована промотором и терминатором другого гена.

Работа поддержана РЦ РМиКТ НП СПбГУ и грантами РНФ 18-14-00050 и РФФИ 20-34-70156.



РАЗРАБОТКА ВЕКТОРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Минкова С.И., Кольцов А.Ю., Сухер М.М., Холод Н.С., Кольцова Г.С.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии,
пос. Вольгинский, Россия

soff.minkoff@gmail.com

Разработка эффективных вакцин против опасных инфекций человека и животных является ключевой задачей биотехнологии в современном обществе. В последнее время использование векторных вакцин на основе безопасных вирусов получило широкое применение. В этом виде вакцин в качестве вектора для доставки антигенов используется рекомбинантный вирус, который не способен реплицироваться в клетках-хозяина, что обеспечивает его безопасность. Среди множества инфекционных заболеваний животных есть группа болезней, которые именуются особо опасными. К их числу относится африканская чума свиней (АЧС), возбудителем которой является ДНК-содержащий вирус. Несмотря на многочисленные попытки получить вакцину против АЧС классическими методами, сделать это до сих пор не удалось. В настоящее время ведется активный поиск антигенов вируса АЧС, способных обеспечить защиту животных от данного вируса. Помимо задачи идентификации потенциальных антигенов и их доставки в организм хозяина также возникает вопрос о создании систем накопления вирусных белков для исследования.

В качестве одного из экспрессионных векторов для наработки белков вируса АЧС нами было предложено использовать вакцинный штамм В82 вируса миксомы кроликов. Использование данного вируса в качестве экспрессионной системы чужеродных генов возможно после получения рекомбинационной кассеты, которая позволит вводить в вирус миксомы гены, кодирующие белки АЧС. В качестве области рекомбинации был выбран межгенный участок M061R/M062R. Для получения рекомбинационной кассеты на первом этапе работы в плазмиду pUC57 были клонированы участки идентичные фрагментам генов M061R и M062R вируса миксомы кроликов, являющиеся «плечами рекомбинации». Между этими «плечами» клонировали ген E183L вируса АЧС и ген репортерного белка RFP, под контролем промоторов P7.5 и P11 осповакцины, соответственно. Данная кассета была использована для получения рекомбинантного вируса миксомы кроликов. Селекцию рекомбинантного вируса проводили по флуоресценции RFP, чистоту полученного вируса подтверждали методами ПЦР и вестерн-блота. Ген E183L вируса АЧС, кодирующий белок p54 выбран в качестве модели для изучения экспрессии гетерологичных белков в данной векторной системе. Анализ экспрессии гена E183L методом вестерн-блота показал продукцию белка p54 при инфекции рекомбинантным вирусом клеток кролика RK-13.

Полученный вирус будет в дальнейшем использован для проверки его иммуногенности и возможности использования в качестве вектора доставки антигенов в организм кроликов и свиней.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ (№ 20-76-10030).



ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ МУТАЦИЙ ГЕНОВ ФАКТОРА ЭЛОНГАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eEF1A, ВЛИЯЮЩИХ НА НОНСЕНС-СУПРЕССИЮ

Михайличенко А.С., Журавлева Г.А., Матвеев А.Г.

Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

anast1221@gmail.com

Гены *TEF1* и *TEF2* у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* имеют почти идентичные рамки считывания, и оба кодируют фактор элонгации трансляции eEF1A. Ранее было показано, что некоторые доминантные мутации в данных генах влияют на нонсенс-супрессию. Чтобы понять механизмы этого влияния, мы задались целью попробовать получить аналогичные рецессивные мутации.

Ранее были получены штаммы с дизрупцией гена *TEF1*. Мы использовали их для получения штаммов, у которых мутантная аллель *TEF2* кодирует единственную форму eEF1A, присутствующую в клетке. Используя для повышения эффективности систему CRISPR/Cas9, мы встраивали мутантную копию *TEF2* вместо *TEF2* дикого типа в данные штаммы. После получения мутаций в штаммах мы оценивали в них уровень супрессии по фенотипу. В качестве маркера для оценки нонсенс-супрессии в данных штаммах используется аллель *ade1-14* (UGA). Так как из-за нонсенс-мутации обрывается биосинтез аденина, в клетках накапливается красный пигмент. При высоком уровне нонсенс-супрессии путь биосинтеза восстанавливается, что фенотипически отражается в более светлой окраске колоний на среде со сниженным содержанием аденина и более интенсивному росту на селективной среде без аденина. Однако штаммы, которые мы использовали для мутагенеза, характеризуются настолько низким уровнем нонсенс-супрессии, что не способны выжить на среде без аденина, поэтому оценку супрессорных свойств мы проводили только по цвету колоний.

После фенотипической проверки полученных штаммов и секвенирования у них гена *TEF2*, оказалось, что нам удалось получить три новые мутации, предположительно являющиеся супрессорными. Одна из них оказалась в сайте уже известных супрессорных мутаций *TEF2-4* и *TEF2-10*. Также мы проанализировали свойства этих мутаций и выяснили, что одна из них обладала плеiotропным эффектом: влияла на цвет колоний и снижала жизнеспособность. При добавлении дополнительной копии гена *TEF2* дикого типа данные эффекты нивелировались, что говорит о том, что мутация скорее всего рецессивная. Остальные две мутации, по-видимому, оказались доминантными. Можно предположить, что полученная рецессивная мутация гена *TEF2* нарушает его жизненно-важные функции, а именно доставку аминоксил-тРНК к А-сайту рибосомы в процессе элонгации трансляции или влияет на ГТФазную активность eEF1A. Дальнейшее изучение полученных мутаций может позволить приблизиться к пониманию механизмов влияния данного фактора на нонсенс-супрессию.

Работа поддержана РЦ РМиКТ НП СПбГУ и грантом РФФ 18-14-00050.



ДЕГРАДАЦИЯ УГЛЕВОДОРОДОВ РАЗНЫХ КЛАССОВ ШТАММОМ *PSEUDOMONAS VERONII* 7-41 В БИСУБСТРАТНОЙ СИСТЕМЕ

**Муллаева С.А.¹, Делеган Я.А.¹, Сазонова О.И.¹, Иванова А.А.¹,
Петриков К.В.¹, Стрелецкий Р.А.², Ветрова А.А.¹**

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия;

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет почвоведения, Москва, Россия

sv.mullaeva@icloud.com

В современном мире особое внимание уделяется проблеме загрязнения окружающей среды. Одним из наиболее перспективных методов очистки окружающей среды считается биоремедиация. В связи с этим, идёт активное изучение способности к утилизации углеводородов нефти разными микроорганизмами. Большинство исследований были проведены для бактерий-деструкторов или индивидуальных углеводородов, или модельного набора нескольких веществ одного класса, а микроорганизмы, обладающие мультидеградативными способностями остаются малоизученными.

Штамм *Pseudomonas veronii* 7-41 способен к деградации среднецепочечных n-алканов (C₈-C₁₂) и полициклических ароматических углеводородов. Полногеномное секвенирование позволило провести анализ кластеров ортологичных генов и выявить, что штамм 7-41 обладает эффективным липидным, углеводным, аминокислотным транспортом и метаболизмом. В геноме обнаружено большое количество диоксигеназ и монооксигеназ, что говорит о разнообразных метаболических способностях и потенциале к разложению углеводородов.

Впервые была выявлена конъюгативная плазида IncP-7 размером около 206 т.п.н, которая содержит полностью функциональные генетические системы, отвечающие за деградацию как полициклических ароматических углеводородов (гены группы *nah*), так и алканов (гены группы *alk*).

Проведенная оценка роста штамма 7-41 в бисубстратной системе (нафталин и декан) по сравнению с моносубстратными системами выявила следующие особенности:

- 1) в бисубстратной системе наблюдалось последовательное потребление сначала алифатического, а потом ароматического углеводородов;
- 2) выявлено накопление салицилата, причем в бисубстратной системе его количество было выше в 4 раза;
- 3) в отличие от моносубстратных систем в бисубстратной системе через 3 суток наблюдалось падение численности клеток;
- 4) в бисубстратной системе не детектировалась активность катехол-1,2 и катехол-2,3 диоксигеназ, а активность салицилат гидроксилазы увеличивалась в 3 раза.

Вероятно, перечисленные особенности могут быть связаны с влиянием декана или продуктов его метаболизма на процесс деградации салицилата (ключевого метаболита нафталина). Штамм *Pseudomonas veronii* 7-41 – уникальный мультидеструктор углеводородов и представляет интерес для дальнейшего изучения процессов деградации мультисубстратных систем. Можно сделать предположение, что при составлении консорциумов микроорганизмов необходимо учитывать взаимовлияние углеводородов разных классов на активность ферментов биодegradации.



МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ СЕЗОННЫХ
КОРОНАВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА ЗА ПЕРИОД С 2017-2021 гг. В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

**Мусаева Т.Д.¹, Писарева М.М.¹, Едер В.А.¹, Ксенафонтов А.Д.¹,
Комиссаров А.Б.¹, Киселева И.В.^{1,2}**

¹ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

tamilamusaeva94@mail.ru

Коронавирусы человека (HCoV) вызывают инфекции верхних и нижних дыхательных путей. HCoV распространены по всему миру, и преобладающие виды могут варьироваться в зависимости от региона или года. Среди эпидемических коронавирусов человека в настоящее время выделяют 4 вида: HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-NKU1.

Геном коронавирусов представлен однонитевой линейной молекулой РНК положительной полярности размером 27–32 тыс. нуклеотидов и является самым протяжённым среди всех РНК-содержащих вирусов.

Целью данной работы являлось ретроспективное исследование распространённости эпидемических коронавирусов человека в Санкт-Петербурге, циркулировавших в эпидемические сезоны с 2017-2021 гг.

Для скрининга использовали мазки из носо- и ротоглотки 20178 пациентов с симптомами ОРИ, собранные с октября 2017 г. по октябрь 2021 г. в Санкт-Петербурге.

РНК HCoVs обнаруживали с помощью наборов реагентов «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзор), видовую принадлежность определяли с помощью праймеров и зондов, полученных из CDC (США, Атланта).

Проведённое ретроспективное исследование позволило оценить распространённость и выявить особенности циркуляции HCoVs в Санкт-Петербурге за последние 5 лет (с 2017 по 2021 гг.). Циркуляция сезонных коронавирусов характеризовалась сменой доминант в зависимости от сезона. В результате исследования были получены следующие данные: в эпидемический сезон 2017-2018 гг. среди сезонных коронавирусов доминировал вид NL63 (68,89%), реже – NKU1 (17,78%) и OC43 (11,11%), HCoV-229E не обнаружен. В эпидемический сезон 2018-2019 гг. с большей частотой циркулировали 229E (45,76%) и OC43 (42,37%), реже – NL63 (10,17%), NKU1 составил 1,69% от общего числа положительных проб. В 2019-2020 гг., так же, как и в 2017-2018 гг., с большей долей преобладал NL63 (71,25%), NKU1 составил 18,75% от общего числа положительных образцов. Реже регистрировались 229E (7,50%) и OC43 (2,50%). В пандемический сезон 2020-2021 гг. преобладал OC43 (53,66%), 229E (44,51%), реже регистрировался NL63 (1,22%), NKU1 не детектировался.

В возрастной структуре заболевших коронавирусы чаще регистрировали у детей до года жизни, реже – у взрослых. Отмечена выраженная зимне-весенняя сезонность.

Таким образом, с 2017 по 2020 года альфакоронавирусы доминировали над бетакоронавирусами. Однако, начиная с осени 2020 года наблюдается резкий пик с преобладанием бетакоронавирусов. Стоит отметить, что в пандемический сезон 2020-2021 было отмечено резкое повышение циркуляции сезонных коронавирусов, практически с полным доминированием бетакоронавирусов.



БАКТЕРИИ РОДА *MICROCOCCLUS* ИЗ ТЕХНОГЕННОГО ЩЕЛОЧНОГО ВОДОЕМА
(г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Нечаева Ю.И.^{1,2}, Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия;

²ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия

ulia-2012@mail.ru

Использование естественного потенциала микроорганизмов сильно загрязненных промышленных территорий может быть одним из инструментов в разработке эффективных технологий, направленных на уничтожение последствий загрязнения окружающей среды высокотоксичными веществами. Значительный интерес вызывают галофильные и алкалофильные микроорганизмы, способные адаптироваться к экстремальным значениям рН и солености среды. В связи с их способностью осуществлять деструкцию органических поллютантов в широком диапазоне экстремальных условий широко исследуется возможность их применения для биоремедиации засоленных и щелочных сред.

Цель работы – характеристика бактерий рода *Micrococcus*, выделенных из техногенного щелочного водоема, расположенного на территории Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВКМКС).

Среди выделенных бактерий рода *Micrococcus* наиболее подробно изучен изолят СХ2-7, у которого предварительно обнаружена способность к использованию в качестве единственного источника углерода и энергии дизельного топлива, нафталина и бифенила. Исследуемый штамм изолирован из образца донных отложений техногенного щелочного водоема, расположенного на территории ВКМКС (г. Березники, Пермский край). Для микробиологических исследований проба донных отложений отобрана с глубины 0,42 метра, в образце определены значение рН (рН=11,52), минерализация (Na^+ 20350 мг/кг; K^+ 12584 мг/кг; Mg^{2+} 3 мг/кг) и количество органического вещества (3,07%). Для выделения микроорганизмов использован метод накопительного культивирования в минеральной среде Пфеннига (NaCl =100 г/л; рН=9,5). В ходе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (831 п.н.) установлено, что изолят СХ2-7 имеет 100%-е сходство со штаммом *Micrococcus luteus* NCTC 2665^T.

Выявлено, что представитель рода *Micrococcus* является алкалофильным и галотолерантным микроорганизмом, способным расти в диапазоне рН=7-11, как в отсутствие NaCl , так и в присутствии до 150 г/л соли в среде культивирования. При этом оптимальная для роста концентрация хлорида натрия составляет 30 г/л.

Таким образом, в микробном сообществе донных отложений искусственного техногенного щелочного водоема на территории ВКМКС (г. Березники, Пермский край) обнаружены галотолерантные/алкалофильные бактерии рода *Micrococcus*. Изолят СХ2-7 представляет интерес для дальнейших исследований и в перспективе может быть использован в биотехнологических целях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 19-44-590011р_а.



ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ ВНУТРЕННЕГО ТЕЛА БАКТЕРИОФАГА ϕ KZ ВНУТРИ КЛЕТКИ ВО ВРЕМЯ ИНФЕКЦИИ

Ничипоренко А.С., Антонова Д.А., Якунина М.В.

ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

anya.nichi@yandex.ru

Бактериофаг ϕ KZ, инфицирующий *Pseudomonas aeruginosa*, имеет один из самых больших известных фаговых геномов. Упаковка огромной молекулы ДНК в капсид происходит с помощью белковой структуры, называемой внутренним телом, на которое геном наматывается как на катушку [1]. Это обеспечивает плотную упаковку ДНК внутри фаговой головки. Известно, что внутреннее тело исчезает из головки бактериофага после впрыскивания ДНК фага в клетку, что наводит на мысль об участии белков внутреннего тела в процессе инфекции. Внутреннее тело представляет собой цилиндрическую структуру, состоящую в основном из белков Gp89, Gp90, Gp93, Gp95, Gp97, Gp162 [2].

Чтобы выяснить возможную функцию и определить локализацию белков внутреннего тела в клетке-хозяине во время инфекции, мы использовали визуализацию с помощью покадровой флуоресцентной микроскопии. Бактерии *P. aeruginosa* штамма PAO1 трансформировали пятью векторными конструкциями: с генами *gp90* и *gp93*, слитыми с геном флуоресцентного белка mCherry и генами *gp95*, *gp97*, *gp162* слитыми с геном mNeonGreen. Клетки растили на среде с индуктором до оптической плотности 0,6 и заражали фагом ϕ KZ. Инфекцию наблюдали под микроскопом, съемка велась раз 10 минут в течение 3 часов. В качестве контроля использовали неинфицированные клетки, содержащие полученные генные конструкции.

Эксперименты показали, что в ходе инфекции ϕ KZ белки слияния сначала равномерно распределены по клетке, а на поздней стадии образуют скопления по обе стороны псевдоядра – белковой структуры, внутри которой располагается ДНК ϕ KZ. Это согласуется с данными о движении заполненных ДНК капсидов по обе стороны от псевдоядра ближе к полюсам клетки [3]. После лизиса из клетки выходит фаговое потомство с, предположительно, включенными в капсид мечеными белками внутреннего тела. Для установления роли белков внутреннего тела на ранней стадии инфекции планируется получение фагового потомства, содержащих белки слияния, и последующая инфекция этими фагами клеток PAO1 под микроскопом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-74-10030.

Литература.

1. Wu, W. et al. Bubblegrams Reveal the Inner Body of Bacteriophage ϕ KZ. Science 2012, doi:10.1126/science.1214120.
2. Thomas, J.A. et al. Proteolysis of Head and Inner Body Proteins by a Morphogenetic Protease in the Giant *Pseudomonas Aeruginosa* Phage ϕ KZ. Mol. Microbiol. 2012, doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08025. x.
3. Chaikeratisak, V. et al. Viral Capsid Trafficking along Treadmilling Tubulin Filaments in Bacteria. Cell 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.032.



ПОДАВЛЕНИЕ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ МЕТАБОЛИТАМИ
BACILLUS SP. MBV-MR

Носков А.Е.^{1,2}, Абашина Т.Н.¹, Антипова Т.В.¹, Ячкула А.А.¹

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пущино, Россия;

²ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Россия
noskov@mail.com

Широкая распространенность фитопатогенных бактерий и вызываемых ими инфекционных поражений растений представляет серьезную проблему для сельского хозяйства. Поэтому поиск новых биоактивных веществ является актуальной задачей.

Нами был выделен с поверхности гриба *Tuber sp.* штамм спорообразующей бактерии MBV-MR, показавший способность к подавлению роста различных представителей бактерий.

Физиолого-биохимические и морфологические свойства штамма определяли при аэробном росте на питательной среде «ИБФМ 5/5». Микроскопию проводили при фазово-контрастном освещении на микроскопе Nikon, Japan. Идентификацию штамма проводили стандартными молекулярно-генетическими методами.

Экстрагирование проводили в этилацетатной системе. Состав экстракта определяли методом тонкослойной хроматографии и методом масспектрометрии.

Проверку наличия у штамма MBV-MR антагонистических свойств осуществляли по наличию зон подавления роста тестируемых культур на агаризованной среде в чашках Петри. Агаризованные среды засеивали в чашках Петри, а на поверхность засеянного агара помещали стерильный бумажный диск, на который наносили 5 мкл 1-2-суточной культуральной жидкости или экстракта. Наличие антагонистических свойств считали доказанным, если зона подавления роста тестируемого организма составляла не менее 0,5 см вокруг диска.

Молекулярно-генетическая идентификация штамма MBV-MR по 16S рДНК показала, что он с 99%-ной достоверностью относится к *Bacillus sp.*

Была проведена проверка подавления ими роста бактерий из Всероссийской коллекции микроорганизмов, а также бактерий из рабочей коллекции лаборатории цитологии ИБФМ РАН. Были обнаружены антагонистические свойства *Bacillus sp.* MBV-MR по отношению к широкому спектру микроорганизмов, наибольшей активностью штамм MBV-MR обладает в отношении Грамположительных бактерий, в особенности других представителей рода *Bacillus*. Спектр антибактериальной активности культуральной жидкости коррелирует со спектром экстракта. Среди метаболитов, содержащихся в экстрактах, выявлено значительное количество веществ пептидной природы.

Представители рода *Bacillis* известны как продуценты большого количества антибактериальных и фунгицидных метаболитов, а штамм *Bacillus subtilis* используют в качестве агентов биоконтроля из-за их высокой приспособляемости и устойчивости в почве в различных условиях окружающей среды. Таким образом, штамм *Bacillus sp.* MBV-MR представляется перспективным для использования в качестве агента антибактериального биологического контроля.



ВЫЯВЛЯЕМОСТЬ ГЕПАТИТОВ В И С ПРИ ПРОВЕРКЕ ДОНОРСКОЙ КРОВИ РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ ДИАГНОСТИКИ

Пасаженикова Я.К., Худокормов А.А.

ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

gmu.zfo2019@mail.ru

Обеспечение безопасности гемотрансфузий – один из актуальных вопросов трансфузионной медицины. Гепатиты В и С относятся к группе инфекционных заболеваний вирусной этиологии с парентеральным механизмом передачи. Вирус гепатита В чрезвычайно контагиозен, являясь наиболее распространенной причиной цирроза и рака печени. При вирусном гепатите С хронизация наблюдается в 85%. Приоритетной задачей Служб крови всех стран значится обеспечение безопасности донорской крови и ее компонентов для пациентов, получающих трансфузии в клиниках.

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Станция переливания крови» города Краснодара – одно из крупнейших учреждений службы крови в ЮФО. Главными задачами служит снабжение в полном объеме полноценными и безопасными компонентами крови медицинских организаций Краснодарского края. Также проводятся организационные работы по агитации и пропаганде донорства среди населения. Станция снабжена современным медоборудованием для переработки и хранения компонентов крови. Стоит отметить, что именно в Службе крови применяются самые актуальные диагностические методики, обладающие максимальной чувствительностью.

Согласно проведенным исследованиям за январь – февраль 2022 года было проверено 14 381 образец донорской крови с целью обнаружения маркеров гепатитов В и С у доноров. На вирус гепатита В методом ИХА было обследовано 10 173 образца крови, из которых 18 было первично положительных, после повторных тестирований методом ИХА было подтверждено 11 образцов, что составило 61%. Последующая проверка методом ПЦР выявила всего 5 положительных проб. Таким образом, 72% первично положительных и 55% подтвержденных образцов крови на вирус гепатита В выявленных методом ИХА не подтвердились методом ПЦР. На вирус гепатита С методом ИХА было обследовано 4208 образцов крови, из которых 16 было первично положительных, после повторных тестирований методом ИХА было подтверждено 15 образцов, что составило 94%. Последующая проверка методом ПЦР выявила всего 5 положительных проб. Таким образом, 69% первично положительных и 57% подтвержденных образцов крови на вирус гепатита С, выявленных методом ИХА, не подтвердились методом ПЦР.



ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА МЕТАГЕНОМНЫХ СООБЩЕСТВ РОССИЙСКОГО ЧЕРНОГО
ТРЮФЕЛЯ *TUBER AESTIVUM*

**Переляева Е.В.^{1,2}, Моргунова М.М.^{1,2}, Дмитриева М.Е.^{1,2},
Бельшенко А.Ю.¹, Аксёнов-Грибанов Д.В.^{1,2}**

¹ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия;

²ООО «Гринтех Байкал», Иркутск, Россия

cat.perelyaeva@gmail.com

Трюфели являются одними из самых ценных продуктов питания и считаются редким деликатесом. Известно, что в трюфелях обнаружено большое число различных биоактивных молекул в дальнейшем применимых в медицине и биофармацевтике. Большинство таких соединений, синтезируются чаще всего не самим трюфелем, а его симбионтами. Микроорганизмы, ассоциированные с плодовым телом трюфелей, могут принадлежать редким родам бактерий и грибов, что увеличивает вероятность обнаружения продуцентов новых биологически активных соединений среди них. Исследования микробиома российского черного трюфеля представлены впервые.

Целью данного исследования является оценка разнообразия симбиотических сообществ черного летнего трюфеля *Tuber aestivum*. Фрагменты плодовых тел трюфеля были отобраны для анализа разнообразия прокариотических и эукариотических сообществ с помощью метагеномного секвенирования (по генам 16S рРНК и ITS соответственно). Черный летний трюфель был собран в окрестностях города Сочи в России.

Согласно полученным данным, плодовое тело *T. aestivum* содержало в бактериальном метагеноме представителей семейства *Enterobacteriaceae* (OTU,% – 95%), среди которых выделяли микроорганизмы родов *Enterobacter* sp. и *Serratia* sp. Также, бактериальное сообщество черного трюфеля представлено родами *Stenotrophomonas* sp. и *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Pedobacter* sp., *Nocardioides* sp., содержание которых в образце не превышало 2%. Так, бактериальное сообщество черного трюфеля *T. aestivum*, представлено филой *Proteobacteria* (99, 6%), а также минорными филами, содержание которых не превышало 0,2% (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*).

Помимо *T. aestivum* (OTU, % – 52%), в состав плодового тела черного трюфеля входили представители класса *Oligohymenophorea* (OTU, % – 11%) и семейства *Sordariales* (OTU,% – 9%), а также организмы родов *Ascobolus* sp. (OTU, % – 9%), *Penicillium* sp. (OTU, % – 3%), *Alternaria* sp. (OTU, % – 3%), *Rhodotorula* sp. (OTU, % – 2%) и т.д. Так, эукариотическое сообщество черного трюфеля представлено грибами (74%), протистами (11%), и неидентифицированными видами (15%).

Таким образом, микробиом российского черного трюфеля *T. aestivum* был представлен почвенными грибами и бактериями. Большинство выделенных микроорганизмов способны к росту на растительных остатках, а также являются паразитами или симбионтами растений. Исследование проводится при основной финансовой поддержке Российского научного фонда, проект 20-76-00001.



ШТАММ *KOCURIA* SP. 69-4 – ДЕСТРУКТОР ФТАЛЕВОЙ И ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТ

Прохорова А.П.¹, Ястребова О.В.²

¹ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия;

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

liprohorova@yandex.ru

Фталаты – изомеры и сложные эфиры *орто*-фталевой кислоты (фталевой, ФК), интенсивно используются в качестве пластификаторов, в производстве полимеров и химических волокон. Теревталева кислота (ТФК) – *пара*-изомер ФК, является основным исходным соединением для получения полиэтилентерефталата наиболее широко используемого термопластика, а также диоктилтерефталата, бесфталадного пластификатора. В связи с широким применением, актуальной является проблема утилизации фталатов, признанных распространенными экополлютантами и опасными для здоровья человека и животных соединениями.

Цель исследования – изучение способности штамма *Kocuria* sp. 69-4 к росту на ФК и ТФК и утилизации этих соединений.

Из рабочей коллекции микроорганизмов лаборатории микробиологии техногенных экосистем «Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» для исследования отобран грамположительный штамм 69-4, выделенный ранее из образца породы каменной соли Верхнекамского месторождения калийных солей (ВКМКС) с глубины 239,7-372,2 м. Штамм был выделен методом накопительного культивирования на богатой среде Раймонда с добавлением 50 г/л NaCl. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма 69-4 показал 100% сходство с аналогичным геном типового штамма *Kocuria rosea* DSM 20447^T.

Установлено, что штамм *Kocuria* sp. 69-4 способен к росту в минеральной среде Раймонда с бензойной, фталевой и терефталевой кислотами в качестве субстратов, используемых в концентрации 1 г/л. Показано, что *Kocuria* sp. 69-4 способен к росту на больших концентрациях ТФК (до 30 г/л). Исследованы параметры роста штамма на ФК и ТФК. Подготовительная фаза роста штамма на данных субстратах (1 г/л) составляла 22 ч и 29 ч, соответственно. При выращивании штамма на ФК зафиксировано более высокое максимальное значение оптической плотности культуры ($OP_{600}=0,84$), чем на ТФК ($OP_{600}=0,72$), при этом удельные скорости роста штамма (μ) на ФК и ТФК отличались незначительно ($0,024 \text{ ч}^{-1}$ и $0,038 \text{ ч}^{-1}$, соответственно). При использовании метода ВЭЖХ установлено, что штамм *Kocuria* sp. 69-4 способен к утилизации 100% ТФК и 99,5% ФК за 77 ч культивирования.

Таким образом, исследуемый штамм *Kocuria* sp. 69-4 способен к эффективной деградации фталевой и терефталевой кислот и является перспективным для дальнейших исследований с целью разработки методов биоремедиации почв и стоков, загрязненных фталатами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ и Министерства образования и науки Пермского края в рамках научного проекта № 19-44-590011р_а.



ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСА МЕТЕЛЬЧАТОСТИ ВЕРХУШЕК КАРТОФЕЛЯ

Пручкина М.А., Шнейдер Ю.А.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, Россия

anadiamena@gmail.com

Картофель (*Solanum tuberosum*) является ценной культурой, широко возделываемой на территории Российской Федерации. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (ФАО), картофель входит в 10 самых производимых культур мира. Вирусы картофеля поражают как семенной, так и продовольственный картофель, вызывая одни из самых экономически значимых заболеваний картофеля. Наиболее опасные из них регулируются многими странами. Один из таких вирусов – вирус мотельчатости верхушек картофеля (Potato mop-top virus, PMTV).

PMTV снижает урожайность, вызывает некротические дуги и кольца на мякоти и поверхности клубней картофеля, что портит его товарное качество, кроме того симптоматические клубни становятся невозможно использовать для переработки.

PMTV передается с поля на поле в инфицированных семенных клубнях, а также с почвой, зараженной покоящимися спорами гриба-вектора вируса – патогена, вызывающего мучнистую паршу картофеля, *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. PMTV выживает в покоящихся спорах этого возбудителя в почве в течение многих лет. Как только PMTV адаптируется на поле, выращивание чувствительных сортов становится невозможным, поскольку покоящиеся споры *S. subterranea* долго сохраняются и устойчивы к засухе и агрохимикатам.

Поскольку PMTV, как и его переносчик, распространен в странах с климатом, схожим с климатом в регионах выращивания картофеля в Российской Федерации, существует вероятность того, что PMTV также может здесь акклиматизироваться и распространиться. Своевременное выявление – одна из основных мер, необходимых для предупреждения распространения PMTV на территории Российской Федерации.

В рамках изучения молекулярно-генетических методов диагностики данного вируса, были проанализированы образцы положительных контролей PMTV фирм Bioreba, Adgen, а также зараженных клубней из коллекции ФГБУ «ВНИИКР».

Результаты проведенных в ФГБУ «ВНИИКР» исследований по изучению PMTV с использованием молекулярно-генетических методов диагностики послужили основой для составления методических рекомендаций по его выявлению и идентификации.



ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕГО ПСИХРОТРОФНОГО ШТАММА *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* X5 ПРИ УМЕРЕННОЙ И НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРАХ РОСТА

Режепова А.А.^{1,2}, Петриков К.В.²

¹ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия;

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия

liregepova@gmail.com

Многие актинобактерии рода *Rhodococcus* обладают деструктивной активностью по отношению к углеводородам нефти. Алканы, входящие в состав нефти, имеют высокую устойчивость к деградации. Для утилизации алканов бактерии-деструкторы обладают специфическими механизмами, позволяющими использовать эти вещества в качестве ростовых субстратов. К таким механизмам относится наличие специфических ферментов – алкан монооксигеназ, отвечающих за первичное окисление. Также алканы являются труднорастворимыми соединениями, и для повышения биодоступности этих гидрофобных субстратов некоторые нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* способны к образованию биологических поверхностно-активных веществ (биоПАВ) гликолипидной природы.

Исследуемый штамм *Rhodococcus erythropolis* X5 известен как деструктор углеводородов в широком диапазоне температур, способный синтезировать биоПАВ.

Была изучена способность штамма к росту на линейных и разветвленных алканах и первичных спиртах при двух температурах: умеренной (28°C) и низкой (6°C). При визуальной оценке роста штамма X5 был отмечен наибольший прирост биомассы на н-декане, н-ундекане, н-додекане, н-гексадекане, н-эйкозане и н-докозане при обеих температурах. Для двух разветвленных алканов (пристан, гептаметилнонан) стабильный интенсивный рост наблюдался только при умеренной температуре на пристане. В парах н-гексана и н-октана при умеренной температуре рост не наблюдался (при низкой проверка не проводилась).

На первом этапе аэробной деградации алканов происходит либо терминальное, либо субтерминальное окисление с образованием соответствующего спирта. Два первичных спирта – гексадекан-1-ол и докозан-1-ол – исследуемый штамм мог использовать в качестве ростовых субстратов при обеих температурах. Это косвенно свидетельствует о том, что путь аэробной деградации соответствующих алканов проходит через терминальное окисление. На декан-1-оле роста *R. erythropolis* X5 не было отмечено. Можно предположить, что в исследуемом штамме окисление декана является субтерминальным с образованием вторичного спирта. Дальнейший метаболизм по данному пути происходит с участием монооксигеназ Байера-Виллигера. По результатам поиска с помощью программы BLAST в геноме *R. erythropolis* X5 было обнаружено два гомолога таких монооксигеназ.

Выделен препарат биоПАВ при росте штамма X5 на гексадекане при 28°C. Построена изотерма поверхностного натяжения для определения критической концентрации мицеллообразования, которая составила около 100 мг/л, и калибровочная зависимость для спектрофотометрического определения по фенол-сернокислому методу.



РЕГУЛЯЦИЯ ДЕЛЕНИЯ *ESCHERICHIA COLI* В ПРОЦЕССЕ SOS-ОТВЕТА

Румянцева Н.А.¹, Голофеева Д.М.¹, Вишняков И.Е.^{1,2}, Ведяйкин А.Д.¹

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

rumyanatasha@yandex.ru

Центральными событиями в жизни бактериальной клетки являются репликация ДНК и последующее деление. В норме деление у *Escherichia coli* начинается с активной полимеризации ключевого белка деления – FtsZ. Его полимеры формируют посередине клетки Z-кольцо, затем там формируется перегородка между двумя дочерними клетками. При повреждении ДНК деление блокируется, пока нарушения не будут устранены. В клетке активируется SOS-ответ, запускающий синтез нескольких генов, включая ген белка SulA, который является прямым ингибитором FtsZ. Точной модели того, как SulA блокирует деление, на данный момент нет; его концентрация в клетке также неизвестна. Существует две основные гипотезы ингибирования: секвестрация (молекула SulA связывается с молекулой FtsZ, понижая его эффективную концентрацию, для этого концентрация SulA должна быть примерно равна концентрации FtsZ) и кэпирование (SulA связывается с концом полимера, приводя к его дестабилизации, необходимая концентрация SulA в этом случае может быть существенно ниже, чем у FtsZ). Информация о концентрации SulA в клетках может помочь выяснить механизм его действия.

Ранее наша группа показала, что при активации SOS-ответа FtsZ формирует структуры, то есть не происходит полной разборки полимеров. Также на модельной системе в *E. coli* было показано, что для ингибирования деления достаточно концентрации SulA как минимум в 4 раза меньше, чем FtsZ. В данной работе нами была выполнена косвенная оценка концентрации SulA во время реального SOS-ответа. Измерение осуществлялось при помощи полуколичественного иммуноблоттинга, а также по измерению уровня флуоресценции (SulA был слит с зеленым флуоресцентным белком mNeonGreen). Сравнение концентраций иммуноблоттингом и при помощи флуоресцентной микроскопии показало, что в клетке SulA в несколько раз меньше, чем FtsZ. Таким образом, полученные данные говорят о том, что для блокировки деления во время SOS-ответа необходима относительно невысокая концентрация SulA. Эти результаты указывают на то, что ингибирование происходит не путем секвестрации. Кроме того, при восстановлении деления после SOS-ответа важную роль играют системы позиционирования Z-кольца (Min-система, нуклеоидная окклюзия). Наблюдение под микроскопом за восстановлением деления клеток штаммов *ΔminC* или *ΔslmA* показало, что именно Min-система играет критическую роль в восстановлении деления.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 22-24-00085.



ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ НУКЛЕОИДА
МИКРООРГАНИЗМА *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS3701 С РЕГУЛЯТОРНОЙ
ОБЛАСТЬЮ *nahAa*

Рыжих Ю.С.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.²

¹ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия;

²ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пушино, Россия

ryzhikh.yuliya@bk.ru

Белки нуклеоида микроорганизма-нефтедеструктора *Pseudomonas putida* BS3701 семейств HNS и HU являются глобальными регуляторами и могут изменять физиологию клетки. В геноме *P. putida* BS3701 находится 5 копий генов, кодирующих белки HNS – HNS_10, HNS_22, HNS_34, HNS_39, HNS_41 и 3 копии генов, кодирующих белки HU – HUa, HUб, HUп. Известно, что белки нуклеоида могут регулировать экспрессию генов внехромосомной ДНК. Регуляторная область *nahAa*, кодирующая нафталин-1,2-диоксигеназу, находится на плазмиде. В связи с этим решено провести реакции связывания некоторых белков семейств HNS и HU с *nahAa* и проанализировать специфичность получаемых комплексов.

В работе использовались препараты рекомбинантных белков нуклеоида HNS (HNS_10, HNS_22, HNS_34, HNS_39, HNS_41) и HU (HUa, HUб, HUп) *P. putida* BS3701, полученные ранее с помощью металл-хелатной хроматографии, и фрагмент регуляторной области гена нафталин-1,2-диоксигеназы, меченный карбоксифлуоресцеином (FAM). Реакцию связывания проводили в буфере состава: 33 мМ трис-ацетат (рН 7,9), 10 мМ ацетат магния, 66 мМ ацетат калия, 0.1 мг/мл BSA, 2.5% глицерин, в течение 15 минут при 28°C. Конечная концентрация белка нуклеоида в растворе 250нМ, конечная концентрация фрагмента ДНК – 2нМ. Специфичность образовавшихся комплексов оценивали, используя 100х избыток (относительно *nahAa*-FAM) ДНК тимуса теленка. Образовавшиеся комплексы разделяли в 6% полиакриламидном геле в нативных условиях, соотношение акриламид:бисакриламид 19:1.

Отсканированные гели, содержащие результаты проведения реакции связывания, показали образование комплексов белков HNS_10, HNS_39, HNS_41, HUa, HUб, HUп с регуляторной областью *nahAa*. Комплексные образования HNS_10, HNS_39, HNS_41 с *nahAa* при добавлении ДНК тимуса теленка не входят в гель. Комплексные образования HUa, HUб, HUп с регуляторной областью *nahAa* при добавлении ДНК тимуса теленка также не входят в гель, при этом появляется свободная *nahAa*, менее интенсивно окрашенная, по сравнению с контрольным образцом.

Белки нуклеоида HNS_10, HNS_39, HNS_41, HUa, HUб, HUп микроорганизма *P. putida* BS3701 могут образовывать неспецифичные комплексы с регуляторной областью *nahAa*, так как не происходит высвобождения свободной *nahAa*. При добавлении ДНК тимуса теленка происходит высвобождение *nahAa* в реакции с белками семейства HU и не происходит, если реакция проходит с белками семейства HNS. Таким образом, HNS_10, HNS_39, HNS_41 *P. putida* BS3701 образуют как неспецифичные, так и специфичные комплексы с *nahAa*, белки HUa, HUб, HUп образуют неспецифичные комплексы с регуляторной областью нафталин-1,2-диоксигеназы.



ВЛИЯНИЕ АКТИВАТОРОВ КАТАБОЛИЗМА И ТИОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ДЕГРАДАЦИЮ НЕФТЕПРОДУКТОВ МИКРОБНЫМ КОНСОРЦИУМОМ

Сандригайло Д.В., Селезнёва А.Д., Жидецкий А.В., Мандрик М.И.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

alisaseleznevavky@gmail.com

Биоремедиация рассматривается как наиболее безопасный, а порой единственно возможный, метод очистки природных сред от ксенобиотиков. Одними из приоритетных химических загрязнителей среды являются нефтепродукты, попадание которых в экосистемы связано с разными сферами деятельности человека. Во многих странах мира разработаны биопрепараты, основу которых составляют бактерии-деструкторы, поэтому актуальной задачей является не столько выделение новых штаммов, сколько подбор условий для быстрой и эффективной очистки загрязненных сред.

Цель работы – изучить влияние активаторов катаболизма и тиоловых соединений на деградацию нефтепродуктов микробным консорциумом в почве.

Для создания модельной системы использовали грунт, загрязненный нефтепродуктами, смешанный с древесными опилками в соотношении 2:1. В ходе работы была исследована эффективность деградации нефтепродуктов микробным консорциумом, включающим бактерии-деструкторы родов *Rhodococcus* и *Bacillus*. Обработку культурами бактерий-деструкторов осуществляли дважды, в день закладки эксперимента и через 14 сут. В качестве потенциальных активаторов процесса биodeградации в начале эксперимента в модельные системы вносили: комплекс удобрений, содержащих азот, фосфор и калий (NPK); хлорид железа (III); глутатион; L-цистеин; цитрат натрия; сукцинат натрия; пиросульфит натрия. Инкубировали при 24-28°C в течение 28 сут. Нефтепродукты экстрагировали хлороформом, количество нефтепродуктов определяли гравиметрически.

В контрольных пробах (без внесения микроорганизмов и добавок) количество нефтепродуктов не изменялось на протяжении 28 сут. и составляло (613,1±12,7) г/кг грунта. При внесении микробного консорциума за 28 сут. происходит снижение концентрации нефтепродуктов до (409,0±12,4) г/кг, т.е. эффективность биodeградации составляет 33,3%. Добавление удобрений NPK стимулирует процесс биodeградации: эффективность повышается до 41,1%. Дальнейшего повышения эффективности деградации, до 51,4 и 49,2%, позволяет добиться внесение глутатиона и L-цистеина, соответственно. Внесение таких активаторов катаболизма, как цитрат и сукцинат натрия, а также FeCl₃ не приводит к повышению эффективности процесса биodeградации нефтепродуктов в почве. Добавление же пиросульфита натрия негативно сказывается на данном процессе: эффективность деградации снижается до 23,6%.

Таким образом, может быть целесообразным для интенсификации процесса биodeградации нефтепродуктов в почву, помимо комплекса удобрений NPK, вносить глутатион и L-цистеин.



СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОСТОЧНОЙ АНТАРКТИДЫ

Сауткина Н.В., Любонец Е.Н., Мямна В.Е.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

sovgirnv@gmail.com

Микроорганизмы Восточной Антарктиды обладают рядом уникальных свойств, в частности, приспособлены к экстремальному климату и способны выдерживать различные стрессовые факторы. Обладая высокой адаптивностью, эти микроорганизмы могут найти применение в промышленности, медицине, биотехнологии.

Целью работы являлось изучение свойств микроорганизмов Восточной Антарктиды, обладающих высоким метаболическим потенциалом при температуре культивирования 18 °С.

В работе использовали образцы грунта 11G29, 11G31, 11G33, 11G35, 11G38, 11G40, собранные в районе Земли Эндерби в регионе оазиса Холмы Тала (Мыс Гнездовой); образец полевого шпата 11S4 и образец грунта 11S11, собранные в районе Земли Королевы Мод в регионе Оазиса Ширмахера (сборщик к.б.н. Д.А. Лукашанец). Выделяли и исследовали свойства микроорганизмов при 18°С. Изоляты, выделенные из одного источника, обозначали порядковыми номерами, например, 11G29-1, 11G29-2 и т.д.

В результате работы создали коллекцию из 62 микроорганизмов, включающую 59 бактериальных изолятов, 2 изолята мицелиальных грибов (11G31-7, 11G31-10), 1 изолят дрожжей (11G35-4). Изоляты 11G29-3 и 11S4-4, представленные грамотрицательными подвижными палочками и способные к флюоресценции, отнесли к роду *Pseudomonas*. Изоляты 11S11-3, 11S11-4, 11S11-5, 11S11-6, 11S11-8, 11S4-2, 11S4-5 по способности образовывать гифы воздушного и субстратного мицелия, отнесли к актинобактериям порядка *Actinomycetales*. При исследовании морфологических свойств клеток изолятов определили, что среди них доминируют неподвижные неспорообразующие грамположительные кокки. Также установили, что из 62 выделенных культур 50 являются психротрофными, а 12 имеют более широкий температурный диапазон роста (растут при 28°С и 37°С).

При изучении ферментативной активности установили, что ни один из 62 изолятов не обладает ДНКазной и пектолитической активностями, 20 изолятов проявляют амилитическую активность, 7 – целлюлолитическую, 23 – казеиназную, 6 – лецитиназную, 19 – желатиназную, а 45 – липолитическую: 40 изолятов проявили эту активность на среде с твином-20, 18 – с твином-20, а 10 – при росте на средах с каждым из твинов. Следует отметить, что 16 изолятов проявляют три и более ферментативные активности.

По предварительным результатам исследования перспективными продуцентами амилаз могут выступать изоляты 11S4-5, 11S11-5, 11S11-6, 11S11-8, 11G31-9 (актиномицеты); целлюлаз – изоляты 11S4-2, 11S4-5, 11S11-3, 11S11-4, 11S11-5, 11S11-6, 11S11-8 (актиномицеты); протеаз – изоляты 11G29-3, 11G29-7, 11S4-4; липаз – изолят 11S11-2; фосфолипаз – изолят 11G29-3.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ГОРОДСКОЙ ПОЛИКЛИНИКЕ № 19

Серикова Я.А., Худокормов А.А.

ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

yana.gurinovich@list.ru

В последнее время пристальное внимание специалистов обращено в сторону возросших проблем возникновения внутрибольничных инфекций в системе здравоохранения по всему миру, в том числе и на территории Российской Федерации. Как известно, для предотвращения внутрибольничных инфекций важен уровень и качество проводимой в ЛПУ профилактической дезинфекции. Стоит отметить, что эффективность проводимой дезинфекции напрямую связана с составом и качеством дезинфицирующих средств.

Целью исследования являлась оценка качества проводимой профилактической дезинфекции и эффективности «БинарОкси» и «Эстилодез», используемых в ГБУЗ «Городской поликлинике № 19» г. Краснодара, путем проведения санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды, с целью контроля микробной обсемененности и эффективности санитарной обработки. Объектами исследования являлись: инвентарь, оборудование, санитарная одежда, руки персонала. Оценка эффективности «БинарОкси» и «Эстилодез» путем сравнительного анализа химического состава указанных препаратов и спектра их эффективности. Смывы с исследуемых поверхностей производили с использованием стерильного тампона через 30 минут, 1 час, 5 часов, 8 часов после проведения профилактической дезинфекции, производили посев на питательные среды для определения таких микробиологических показателей как БГКП, присутствие *S. aureus*; общую микробную обсемененность; общие колиформные и термотолерантные бактерии. Оценка эффективности «БинарОкси» и «Эстилодез» производилась путем анализа роста колоний микроорганизмов на питательных средах, в случаях обнаружения роста колоний или сомнительного результата, дополнительно проводили микрокопирование.

Проведя сравнительный анализ спектра эффективности различных групп микробиологических активных веществ, установлено, что «БинарОкси» и «Эстилодез» эффективны в отношении Грамположительных бактерий, Грамотрицательных бактерий, микобактерий, плесневых грибов, дрожжей, но эффективны лишь в отдельных случаях в отношении вирусов, что собственно никак не отражается на показателях микробиологического контроля. Антибактериальная эффективность дезинфицирующего препарата «БинарОкси» составила 98%, а препарата «Эстилодез» 96%.



ИНДИКАЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ГЕНОВ ФЕРМЕНТОВ У БАКТЕРИЙ ВИДА *PSEUDOMONAS STUTZERI*

Сульдина Е.В., Феоктистова Н.А., Федотова Т.А., Богданов И.И., Мاستиленко А.В.

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина,
Ульяновск, Россия

e.suldina2006@yandex.ru

Почва – важный и ценный природный ресурс, поддерживающий жизнь на Земле. Часто, из-за воздействия различных абиотических, биотических и антропогенных факторов нормальные процессы функционирования почвы нарушаются.

Таким образом, восстановление баланса структуры, состава, физико-химических и биологических свойств почвы имеет первостепенное значение для предотвращения возможного неблагоприятного воздействия на живые системы и сохранения окружающей среды.

Ученые многократно подтвердили эффективность внесения ризобактерий для повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Положительный эффект от применения ризобактерии связан с их способностью к продукции вторичных метаболитов, фитогормонов, внеклеточных ферментов, а также процессами азотфиксации и солюбилизации фосфора и калия. Бактерии вида рода *Pseudomonas* часто используют в составе биокомпозиций для улучшения биодоступности почвенных макроэлементов и индукции системной устойчивости у растений.

В связи с этим цель исследований заключалась в поиске генов, отвечающих за синтез ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы у штаммов бактерий вида *Pseudomonas stutzeri* методом ПЦР в режиме реального времени.

В работе были использованы 6 штаммов бактерии вида *Pseudomonas stutzeri* полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновского ГАУ.

Культуры бактерий обладали типичными для данного вида культуральными, морфологическими и биохимическими свойствами.

Для определения наличия генов, кодирующих ферменты фитазу, нитрогеназу и фосфатазу у *Pseudomonas stutzeri* был проведен анализ *in-silico* аннотированных геномов данного вида бактерии представленных в информационной базе данных NCBI. В результате этого были установлены гены, кодирующие искомые ферменты.

Был произведен подбор праймеров для скрининга целевых участков. Амплификацию проводили по стандартному протоколу. Детекцию результата амплификации проводили при помощи канала FAM.

По результатам проведенных экспериментов у 4 из 6 штаммов *Pseudomonas stutzeri* присутствовали все три участка генов отвечающих за синтез ферментов фитазы, нитрогеназы и щелочной фосфатазы, что дает определить их как кандидатные для включения в состав поликультурной биокомпозиции для солюбилизации почвенных макроэлементов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области в рамках научного проекта № 19-416-730004.



ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ШТАММА ВИРУСА ОСПЫ СВИНЕЙ, ВЫДЕЛЕННОГО В РОССИИ, В КАЧЕСТВЕ ВЕКТОРА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ

Сухер М.М., Кольцов А.Ю., Холод Н.С., Кольцова Г.С.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии,
пос. Вольгинский, Россия

Suhermail@mail.ru

Преимуществом вирусных векторных вакцин является их способность вызывать как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ на антиген, доставляемый вектором. Однако одной из основных проблем использования таких вакцин является патогенный потенциал вируса, используемого в качестве вектора. В связи с чем, особое внимание должно быть уделено изучению безопасности вирусных векторов. В качестве одного из перспективных вирусных векторов были предложены осповирусы и в частности вирус оспы свиней. За счет высокой видовой специфичности и возможности экспрессировать большое количество чужеродных белков вирус оспы свиней имеет ряд преимуществ в качестве векторной вакцины против патогенов свиней.

Целью данного исследования было изучение возможности использования штамма вируса оспы свиней, выделенного в России, в качестве вирусного вектора.

Вирус был выделен на первичной культуре клеток тестикул поросенка и адаптирован к перевиваемой культуре клеток РК-15. Для изучения патогенных свойств адаптированный вирус (6 lg ТЦД₅₀) использовали для заражения свиней. Ежедневно проводили клинический осмотр, отбор крови и взятие мазков из носовой и ротовой полостей. Через 12 дней у подопытных свиней были обнаружены везикулярные поражения. Других клинических признаков заболевания не наблюдалось ни у одного из животных. Анализ с использованием ПЦР в реальном времени показал, что все образцы крови не содержали ДНК вируса, что свидетельствует об отсутствии виремии. Однако было продемонстрировано наличие вирусной ДНК в мазках из полости рта и носа, взятых в диапазоне от 8 до 30 дней после заражения. Часть положительных в ПЦР образцов использовали для выделения вируса в первичной культуре клеток тестикул поросенка. Вирус был успешно выделен из всех отобранных образцов. Эти результаты указывали на присутствие инфекционного вируса в образцах оральных и назальных мазков.

Таким образом, в рамках проведенных экспериментов было продемонстрировано, что штамм вируса оспы свиней, выделенный на территории России и адаптированный к культуре клеток РК-15, характеризовался низкой патогенностью для свиней. Мы предполагаем, что предложенный штамм может быть использован в качестве вирусного вектора для экспрессии чужеродных белков других патогенов свиней, в том числе вируса африканской чумы свиней. Однако присутствие инфекционного вируса в образцах оральных и назальных мазков в течение длительного периода указывает на то, что необходимо генетически модифицировать данный штамм с целью снижения его вирулентности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (№ 20-76-10030).



ИЗУЧЕНИЕ ЭТИОЛОГИИ ПЯТНИСТОСТЕЙ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

Сущенко А.С.¹, Колганихина Г.Б.², Виноградова С.В.¹

¹ФИЦ Фундаментальные основы биотехнологии РАН, Институт биоинженерии, Москва, Россия; ²ФГБУН Институт лесоведения РАН, п/о Успенское, Россия

coatprotein@bk.ru

Ежегодно сельское, лесопарковое хозяйство и лесная промышленность сталкиваются с экономическими потерями из-за инфицирования растений патогенами, что проявляется в потере урожая, убытках в программах озеленения городов и снижении качества и количества материалов, поставляемых для нужд деревообрабатывающей промышленности. Немалая доля ущерба вызвана поражением фитопатогенными бактериями. Основными методами их детекции и установления этиологии заболеваний являются визуальная и лабораторная диагностика.

При проведении фитосанитарного мониторинга в Теллермановском опытном лесничестве (Воронежская область) и заповеднике Галичья гора (Липецкая область) на клене татарском (*Acer tataricum*) были обнаружены пятнистости, предположительно бактериальной этиологии. Симптомы наблюдали на молодых ветвях, листовых пластинках, черешках и плодах растений. Целью данной работы является определение этиологии обнаруженных пятнистостей с использованием молекулярно-генетических и микробиологических методов.

Навеску 0,1 г образцов с симптомами стерилизовали 0,5% раствором KMnO₄ в течение 1 минуты, затем промывали в стерильной дистиллированной воде и суспендировали в пробирке с 300 мкл стерильной воды. Через 15 минут отбирали 50 мкл суспензии и равномерно рассеивали шпателем по чашке Петри с питательной средой King B. Через 24-48 часов полученные единичные колонии рассеивали методом истощения для получения чистой культуры. В результате были обнаружены бактерии, по фенотипу схожие с бактериями рода *Pseudomonas*. Суспензией бактерий с OD 0,4 инокулировали молодые листья табака, через 24-48 часов наблюдали образование некрозов. В дальнейшем для определения вида бактерий будут применены молекулярно-генетические методы. Полученные изоляты будут охарактеризованы с помощью микробиологических и биохимических тестов.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ и БРФФИ в рамках научного проекта № 20-54-00045 на базе оборудования ЦКП «Биоинженерия» и ЭУИК (U-73547).

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-БЕНЗОКСАЗИН-2-ОНА НА ДЫХАТЕЛЬНУЮ ЦЕПЬ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI*

Триандафилова Г.А., Смирнова Г.В., Тюленев А.В., Октябрьский О.Н.

ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

lindick@ya.ru

В связи с распространением резистентности бактерий к используемым препаратам, поиск новых антибактериальных веществ является актуальной задачей. Ранее было установлено, что отдельные представители производных 1,4-бензоксазин-2-она обладают



антимикробным действием. Так, соединение СВР-384 из этого ряда показало наличие противотуберкулезной активности. Согласно нашим данным, соединения СВР-384 и СВР-386 (близкий аналог соединения СВР-384) обладают бактериостатическим действием в отношении бактерий *E. coli*, минимальная ингибирующая концентрация составляет 0,5 и 0,25 мМ, соответственно. При переходе от аэробных условий культивирования к микроаэробным наблюдается увеличение бактериостатического действия. Обнаружено также, что СВР-384 снижает активность фермента MenB, участвующего в синтезе компонента дыхательной цепи менахинона. Это свидетельствует о том, что бактериостатическое действие данных веществ может быть связано с их влиянием на дыхательную цепь бактерий. Для подтверждения данной гипотезы было проведено исследование влияния обоих веществ на рост мутантных штаммов *E. coli* с делециями по менахинону (*menA*), убихинону (*ubiC*) и субъединицам АТФазы (*atpA*, *atpB*, *atpC* и *atpE*).

Исследование проводили в аэробных условиях при концентрации веществ равной ½ МИК. Наибольшее ингибирующее действие соединения СВР-384 оказывало на рост мутанта *menA*, через 15 минут после добавления вещества наблюдалось снижение скорости роста бактерий в 7,6 раза (у родительского штамма – в 4,8 раза). Обработка СВР-384 культуры *ubiC* снижала скорость роста в 4 раза. В этих условиях скорость роста мутантов по АТФазе снижалась примерно в 2 раза. При действии СВР-386 на родительский штамм и все мутанты *E. coli*, кроме *ubiC*, наблюдалось ингибирование роста, носящее двухфазный характер. У мутантов по АТФазе обнаружены различия в кинетике ответа на его действие. Примечательно, что вещества, отличающиеся только метильным и трет-бутильным радикалами, оказали влияние на разные компоненты одной системы.

Полученные данные подтверждают влияние производных 1,4-бензоксазин-2-она на дыхательную цепь бактерий *E. coli*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90016.

МЕДЬСОДЕРЖАЩАЯ ОКСИДАЗА ИЗ АКТИНОБАКТЕРИИ *STREPTOMYCES OCHRACEISCLEROTICUS*

Трубицина Л.И., Трубицин И.В., Лисов А.В., Леонтьевский А.А.

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пущино, Россия

lyubov_yurevich@mail.ru

Бактериальные двухдоменные лакказы – оксидоредуктазы, обладающие высокой термостабильностью, оптимумом окисления фенольных соединений при нейтральном-щелочном значениях рН, низким окислительно-восстановительным потенциалом. Несмотря на низкую окислительную активность, двухдоменные лакказы в паре с медиатором способны окислять широкий спектр красителей различной природы, таким образом могут быть использованы в целях биоремедиации. В настоящее время поиск новых двухдоменных лакказ, обладающих средним или высоким окислительно-восстановительным потенциалом, является актуальной задачей. Обнаружение новой двухдоменной лакказы с повышенной



окислительной активностью и высокой термостабильностью позволит создать коммерческий препарат для различных биотехнологических направлений, который сможет конкурировать с широко используемыми в настоящее время препаратами грибных трёхдоменных лакказ.

В геноме бактерии *Streptomyces ochraceiscleroticus* ВКМ Ас-651 был идентифицирован ген медьсодержащей оксидазы. Белок WP_031060324.1 классифицировали как двухдоменную лакказу. Для проведения работы по клонированию целевого гена была выделена геномная ДНК из *S. ochraceiscleroticus* ВКМ Ас-651, разработаны праймеры для амплификации гена, а также для клонирования гена в экспрессионный вектор pQE-30. Полученная генетическая конструкция pQE-30::*osl* была трансформирована в штамм *Escherichia coli* M15 (pRep4). При экспрессии в *E. coli* наблюдалась продукция рекомбинантного белка с высокой ферментативной активностью. Одностадийную очистку проводили с помощью аффинной хроматографии: на колонке с Ni-сефарозой. Элюция лакказы с колонки проводилась буфером с 300 мМ имидазолом.

Лакказа была способна окислять субстрат АБТС в диапазоне рН от 2,5 до 5,5, с максимальной активностью при рН 3,5. Фенольное соединение 2,6-диметоксифенол окислялось лакказой в диапазоне рН от 6,5 до 10,0. Максимальная активность в отношении фенольного соединения фермент проявлял при рН 9,0. Лакказа сохраняла 70% от своей начальной активности после часа инкубирования при 70°C, 50% от начальной активности после часа инкубирования при 80°C. Фермент был более стабилен при щелочных значениях рН: сохранял 75% и 59% от начальной активности после пяти суток инкубирования при рН 9 и рН 11, соответственно. K_m в отношении 2,6-диметоксифенола составила 0,76 мМ.

Таким образом, в рамках данного исследования была проведена работа по клонированию новой двухдоменной лакказы, обладающей высокой термостабильностью, оптимумом окисления фенольного соединения 2,6-диметоксифенола при рН 9,0, высокой рН-стабильностью при рН 9,0-11,0. Планируется дальнейшее исследование свойств полученного рекомбинантного фермента, а также исследование возможности биотехнологического применения двухдоменной лакказы.

ПОДБОР СПОСОБА ВЫДЕЛЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ *PASTEURELLA MULTOCIDA* ИЗ ОБЪЕКТОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

Хайсанова В.С., Феоктистова Н.А.

ФГБОУ ВО Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина,
Ульяновск, Россия

vlada240535@mail.ru

Бактериофаги имеют ряд преимуществ в качестве альтернативного лечения для человека и животных, чтобы уменьшить злоупотребление антибиотиками и избежать их побочных эффектов, поскольку было показано, что бактериофаги обладают высокой специфичностью, самостоятельно дозируются и, как правило, нетоксичны. Бактериофаги играют важную роль в эволюции бактерий и в появлении новых патогенных штаммов, опосредуя горизонтальный перенос генов вирулентности.



Цель исследования: подобрать параметры выделения бактериофагов, специфичных для штаммов *Pasteurella multocida* из объектов внешней среды. Для достижения поставленной цели выбрали метод обогащения «с подсевом» с последующими вариантами обработки суспензии. На разных штаммах индикаторных культур *Pasteurella multocida* зоны лизиса обнаружены в образцах фекалий диких животных, обработанные трихлорметаном 1:10 в течении 30 мин (штаммы бактерий *Pasteurella multocida*: Р.м-7, Р.м-37, Р.м- 98), а также в образцах, которые подверглись температурной обработке 50°C в течении 30 мин (штаммы бактерий *Pasteurella multocida*: Р.м-7, Р.м-37, Р.м- 98). В результате проведенной работы выявлены зоны лизиса индикаторной культуры при двух способах воздействия на разведение пробы: введение трихлорметана в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании во временном диапазоне 30 мин и прогревание при температуре 50°C в течение 30 минут. При изучении морфологии было отмечено, что зоны лизиса фага на разных штаммах отличались друг от друга при использовании на газонах различных индикаторных культурах. Интерпретация полученных результатов требует дополнительных исследований. Исследования проводятся в соответствии с Тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2022 году.

Литература.

Cid D. et al. *Pasteurella multocida* isolates associated with ovine pneumonia are toxigenic //Veterinary microbiology. – 2019. – Т. 232. – С. 70-73.

Сульдина Е.В. и др. Характеристика бактериофагов бактерий *Enterobacter* spp. для оценки возможностей их использования в составе терапевтического биопрепарата //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – №. 1 (41). – С. 109-115.

УКОРОЧЕННЫЕ ФОРМЫ ГЕМОЛИЗИНА II ВЛИЯЮТ НА ПОРОФОРМИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ И ОБЕСПЕЧИВАЮТ АГГЛЮТИНАЦИЮ

Хлебалина Н.А.¹, Лучкина П.Н.¹, Булавина М.К.¹, Замятина А.В.², Каратовская А.П.²

¹ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
Пустьино, Россия;

²Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова, Пустьино, Россия

av_siunov@rambler.ru

Исследование патогенности микроорганизмов – одна из фундаментальных проблем современной микробиологии. Важная роль в бактериальном патогенезе принадлежит цитолитическим порообразующим токсинам (ПОТ), но до сих пор неясно, каким образом бактериальная клетка защищается от действия собственных ПОТ [3].

Порообразующий токсин *Bacillus cereus* – гемолизин II (HlyII) широко распространен среди *Bacillus sensu lato*. При анализе иммунофореграм рекомбинантного HlyII, с помощью моноклональных антител против С-концевого домена выявлены его укороченные формы, включающие HlyIIICTD (M225 по I412) и HlyIICTD (D319 по I412). В штаммах *Bacillus anthracis* ген *hlyII* имеет мутацию сдвига рамки, которая затем восстанавливается. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* содержит профаг pHIS3501 внутри гена HlyII. В обоих случаях



возможно образование С-терминальных фрагментов гемолизина II [1]. Изучение их функции проводили на клонированных в *E. coli* вариантах. Большая часть HlyIIICTD находилась в клеточном дебрисе, дальнейшую очистку проводили на Ni-NTA в присутствии 6М мочевины с последующим рефолдингом. HlyIIICTD в денатурированном и ренатурированном состоянии не проявлял гемолитической активности на эритроцитах кролика, но обеспечивал агглютинацию эритроцитов в растворе с дальнейшим их налипанием на стенки пробирки. С помощью световой микроскопии эффект был подтвержден, при этом эритроциты сохраняли жизнеспособность.

Мономеры HlyIICTD и HlyIIICTD связываются с цитоплазматической мембраной, а при взаимодействии с мономерами HlyII формируют гетероолигомеры неправильной структуры. При связывании укороченных форм HlyII с рецептором на поверхности клетки ограничивается присоединение HlyII к рецептору, что в обоих случаях подавляет формирование зрелой поры. Используя эту стратегию бактериальная клетка, вероятно, способна защититься от действия собственных ПОТ, а укороченные формы выступают в качестве антитоксина.

В ходе исследования показано, что укороченные формы HlyII при определенных концентрациях подавляют гемолитическую активность, а HlyIIICTD способствует агглютинации эритроцитов [2].

Литература.

1. Руденко с соавт. Биоорганическая химия, 2020, том 46, № 3, с. 280–285
2. Хлебалина с соавт. Генетические технологии в микробиологии и микробное разнообразие: сборник тезисов. М.: ГЕОС, 2021. 302 с. ISBN 978-5-89118-845-7.
3. Miles G., Bayley H., Cheley S. Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: A heptameric transmembrane pore. *Protein Science* (2002), 11:1813-1824.

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ О МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВАХ СОДЕРЖИМОГО КИШЕЧНИКА РАДУЖНОЙ ФОРЕЛИ (*PARASALMO MYKISS*) АКВАКУЛЬТУРНЫХ ХОЗЯЙСТВ АРХАНГЕЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

Червочкина А.С.

ФГАОУ ВО Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова,
Архангельск, Россия

a.chervochkina@narfu.ru

Объем товарной аквакультуры в Архангельской области покрывает всего 0,03% необходимого для обеспечения внутреннего спроса. Увеличение выработки продукции из ценных видов рыб в настоящее время невозможно без применения современных подходов в мониторинге состояния объектов ихтиофауны в хозяйствах. Один из важных параметров функционирования живых организмов – структура микробиоты кишечника, которая тесно связана с внешними и внутренними факторами. Цель исследования – определить состав микробиологического сообщества ЖКТ радужной форели (*Parasalmo mykiss*), культивируемой в бассейне реки Северная Двина, юг Архангельской области.



Отбор проб проводили у двух возрастных групп рыб: 0+ и 1+. Выделение геномной ДНК из содержимого кишечника особей проводили с использованием набора Macherey-Nagel nucleic spin kit (Macherey-Nagel, Düren, Германия), а для метагеномного анализа использовали универсальные праймеры F515 и R806 на варибельную область V3-V4 гена 16S рРНК (ЦКП «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ).

В составе микробиома особей до года доминирует отдел Verrucomicrobita (род Candidatus Udaeobacter). В возрастной категории от года до двух лет доминирующим отделом являются Actinobacteriota. Бактерии отделов Proteobacteria (классы Alpha- и Gammaproteobacteria), Acidobacteriota и Bacteroidota одинаково представлены в обеих возрастных группах. У рыб возраста 1+ наблюдается преобладание в микробиоме (35% от идентифицированных прокариот) Peptostreptococcus, который отсутствует у особей до года. Данный род является индикатором быстрорастущей рыбы. Также в этой возрастной категории присутствует Streptococcus, представители которого могут представлять опасность для здоровья организма. С возрастом в микробиоме увеличивается количество Paucibacter (6% у 0+ и 12% у 1+), по данным статьи Draft Genome Sequence of Paucibacter aquatile CR182T, a Strain with Antimicrobial Activity Isolated from Freshwater of Nakdong River in South Korea представители этого вида часто устойчивы к токсинам и антибиотикам. Присутствие Mucosocota в обеих возрастных группах объясняется тем, что это типичный отдел для водной среды. У молодых особей в составе микробиоты в небольших количествах (0,1%) наблюдается археи, которые не идентифицируются у взрослых рыб.

Исследования выполнены в рамках технологического проекта «Биотехнологии в Арктике: комплексная, безотходная переработка морских водорослей и воспроизводство агро- и аквакультур в условиях Арктического региона» НОЦ «Российская Арктика».

ИЗУЧЕНИЕ ГРИБОВ ИЗ РОДА *FUSARIUM* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

Шварцев А.А.^{1,2}, Башкирова И.Г.^{3,4}, Пыльнев В.В.²

¹ООО «Синтол», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», Москва, Россия;

³ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», Быково, Россия;

⁴ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, Россия

alexey.sva@yandex.ru

Представители из рода *Fusarium* являются одними из особо опасных фитопатогенных микроорганизмов. Фузариумы поражают огромное разнообразие культур: злаковые, плодовые, ягодные, овощные, декоративные и др., вызывая увядание растений, размножаясь в сосудистой ткани; повреждение колоса и зерна, плодов и семян; гниль различных частей растений; корневую гниль. Фузариозное заболевание влияет на количество и качество получаемой сельскохозяйственной продукции. Быстрая и точная диагностика фитопатогенных микроорганизмов рода *Fusarium* с помощью метода ПЦР необходима для ограничения распространения вредных организмов на территории страны, которые приводят к потере урожая.



Одной из задач нашего исследования являлось изучение фитопатогенных грибов из рода *Fusarium* с использованием молекулярно-генетических методов диагностики. В работе проводили идентификацию культур грибов из рода *Fusarium*, полученные из коллекции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, методом секвенирования по гену 18S рНК. Полученные нуклеотидные последовательности грибов изучали с помощью программы UGENE («УНИПРО», Россия) и базы данных NCBI (The National Center for Biotechnology Information). Полученные результаты идентификации фузариумов из коллекции подтвердили принадлежность используемых культур к видам *F. acuminatum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. verticilloides*. Данные виды грибов из рода *Fusarium* используются в наших дальнейших исследованиях по разработке методов их выявления и идентификации с помощью ПЦР.

ОЦЕНКА МЕТАГЕНОМНЫХ СООБЩЕСТВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ-ОКСИФИЛОВ ОЗЕРА БАЙКАЛ

**Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Переляева Е.В.,
Белышенко А.Ю., Аксёнов-Грибанов Д.В.**

ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

shelkovnikova551@gmail.com

Озеро Байкал представляет собой экосистему с низкой температурой воды и высоким содержанием растворенного кислорода. Предполагается, что в таких условиях обитают бактерии – оксифилы, сформировавшие защитные механизмы от окислительного стресса путём синтеза антиоксидантов.

Целью данного исследования являлась оценка разнообразия метагеномных сообществ воды озера Байкал в очагах с повышенным содержанием кислорода и антиоксидантной активности выделенных штаммов.

Проботбор байкальской воды был проведён в пос. Большое Голоустное и пос. Бугульдейка (Южный Байкал) из 4 зон с различными концентрациями кислорода – 9,97 мг/мл, 10,78 мг/мл, 11,91 мг/мл, и 12,19 мг/мл. Часть воды была профильтрована через бактериальные шприц-фильтры и отправлена в ООО «Биоспарк» для метагеномного профилирования. Оставшаяся проба воды была использована для микробиологических посевов, направленных на селективное выделение оксифильных микроорганизмов, и оценки их антиоксидантной активности с помощью метода DPPH.

Согласно первичному анализу разнообразия микробных оксифильных сообществ, в образцах, выделенных из зоны с наибольшей концентрацией кислорода, было обнаружено 3 минорные бактериальные филы исключительные для данной зоны. К ним относились филы *Armatimonadetes* (OTU, % – 0,04%), *Epsilonbacteraeota* (OTU, % – 0,1%), *Spirochaetes* (OTU, % – 0,02%). Также, во всех группах, различных по содержанию кислорода присутствовала фила



Cyanobacteria (класс *Oxyphotobacteria*). Однако в образце с повышенным содержанием кислорода содержание таких бактерий было существенно выше (OTU, % – 38%). В образцах, отобранных в зонах более низких концентраций кислорода, *Oxyphotobacteria* являлись минорным классом бактерий (OTU, % – 1-5%). Во всех зонах были обнаружены такие филы, как *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*. Однако, в зоне с более высоким содержанием кислорода найдены отдельные представители родов *Brachybacterium* (OTU, % – 0,04%), *Porphyromonas* (OTU, % – 0,02%), *Murdochella* (OTU, % – 0,06%), *Bacillus* (OTU, % – 0,04%), *Abiotrophia* (OTU, % – 0,04%), *Peptoniphilus* (OTU, % – 0,02%). При селективном выделении оксифильных микроорганизмов было выделено 27 штаммов, из которых на данный момент антиоксидантную активность проявили 8. В настоящее время ведётся идентификация микроорганизмов и оценка состава антиоксидантов, синтезируемых выделенными штаммами.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственная регистрация 121111100025-5) и гранта Президента Российской Федерации № МК1245.2021.1.4.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МАТРИЦЫ НА ПРОХОЖДЕНИЕ ПЦР ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ЧЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТОМАТА

Яремко А.Б., Писарева И.Н., Приходько С.И.

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений», р.п. Быково, Россия

an_ya94@mail.ru

Черная бактериальная пятнистость томата широко распространена в мире и наносит значительный ущерб при выращивании томата и перца. Возбудителями данной болезни являются четыре вида бактерий рода *Xanthomonas* (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri*, *X. euvesicatoria* pv. *perforans*). Для выявления *Xanthomonas* spp. рекомендуется изоляция на агаризованные питательные среды с последующим скринингом подозрительных колоний с использованием серологических и молекулярных методов. Недостатками данного подхода являются опасность подавления роста целевой бактерии сопутствующей микрофлорой, большие трудозатраты и длительный срок проведения исследований. Оптимизировать рабочий процесс можно с включением этапа выделения ДНК из экстракта семян (растительная матрица). Однако, существует риск получения недостоверных результатов, связанных с ингибированием ПЦР.

Целью работы является изучение влияния матрицы на прохождение ПЦР при выявлении *Xanthomonas* spp. Для установления степени влияния растительной матрицы на конечные результаты исследований семян томата нами был проведен опыт по их искусственному заражению возбудителями черной бактериальной пятнистости томата. В работе использовали типовые штаммы четырех изучаемых видов рода *Xanthomonas* (DSMZ, Германия) для приготовления проб с разным уровнем зараженности: 100%, 10%, 5%, 1%. Выделение ДНК проводили коммерческим набором «Проба ГС» (ООО «АгроДиагностика», Россия). Для выявления и идентификации *Xanthomonas* spp. использовали ПЦР в реальном



времени в соответствии с протоколом испытаний Международной федерации по семеноводству (ISF) на термоциклере CFX96 C1000 Touch («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Для оценки уровня ингибирования ПЦР использовали внутренний положительный контроль (ВПК), синтезированный отечественной компанией ООО «Синтол».

В ходе анализа результатов ПЦР, установили, что при всех уровнях зараженности семян происходит выявление *Xanthomonas* spp. и отсутствует ингибирование реакции.



БИОФИЗИКА И БИОИНФОРМАТИКА

АНАЛИЗ КРИВОЙ ДОЖИТИЯ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИФАЗНОЙ МОДЕЛИ

Алексеев А.А.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

alekseev@physics.msu.ru

В изучении старения часто используются кривые дожития, которые показывают уменьшение доли оставшихся животных с течением времени относительно исходного количества. Эти кривые используются для вычисления средней и максимальной продолжительности жизни. Например, для карликовых мышей Эймса показано замедление старения [1]. При этом теоретические модели Гомертца и Вейбулла [2] не позволяют точно описать кривые дожития из базы [3].

Нами была поставлена задача описание всего разнообразия кривых смертности для ряда животных различных групп (насекомые, пресмыкающиеся, млекопитающие) с помощью одной модели с различными значениями параметров для разных видов животных. Ранее в работе [4] рассматривалась двуфазная модель старения, в основу же нашей численной модели было положена кусочно-заданная зависимость для коэффициента смертности от возраста, имеющая 5 фаз, включая фазу высокой смертности после рождения, уменьшение смертности в зрелом возрасте и экспоненциальный рост смертности (с определённого возраста) при старении. Модель также учитывает гетерогенность популяции по «исходному здоровью» и описывает уменьшение стресс-устойчивости (СУ) организма при воздействии случайных внешних факторов, причём скорость снижения СУ связана с явной функцией, пропорциональной априорно взятой многофазной зависимости коэффициента смертности от возраста.

Вычисления производились с помощью языка программирования R, оптимизационная задача (фиттинг) решалась с помощью функции `optim`, доверительные интервалы оценивались с помощью бутстрепа. Таким образом, были получены наборы коэффициентов модели, и показана эффективность многофазного подхода.

Литература

1. Bartke A. et al. Extending the lifespan of long-lived mice // Nature. – 2001. – Т. 414. – №. 6862. – С. 412.
2. Крутько В.Н., Донцов В.И. Системные механизмы и модели старения // М.: URSS. – 2008.
3. Human Mortality Database, <https://www.mortality.org/>
4. Марчук Г.И. Геронтология in silico: становление новой дисциплины. – 2007.



КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ,
СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКОМ, ВОЗМОЖНО ОТСЛЕЖИВАТЬ С ПОМОЩЬЮ
КРАСИТЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХРОМОФОРА GFP

**Беловсов А.С.¹, Маслов И.А.¹, Хорн П.А.¹, Мишин А.С.²,
Баранов М.С.², Борщевский В.И.¹**

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет) Долгопрудный, Россия;

²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

belousov.as@phystech.edu

Рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR), представляет собой трансмембранный белок с семью α -спиралями. Рецептор, использующийся в работе, регулирует потребность миокарда в кислороде и увеличивает коронарное кровообращение за счет расширения сосудов. Кроме того, этот рецептор может подавлять активность иммунных клеток, тем самым защищая ткани от воспаления. В головном мозге он играет важную роль в регуляции высвобождения глутамата и дофамина, что делает его потенциальной терапевтической мишенью для лечения бессонницы, депрессии и болезни Паркинсона.

Для изучения структуры рецептора, поиска лигандов, ранее применялось множество биофизических методов, в том числе ЯМР, кристаллография, криоэлектронная микроскопия, флуоресцентная микроскопия (с использованием методов FRET и FLIM), методы молекулярной динамики, связывание радиогандов. Этими методами были обнаружены десятки лигандов.

Из всех перечисленных методов отдельно можно выделить флуоресцентную микроскопию. Одним из интересных ее направлений являются сольватохромные флуоресцентные красители, которые способны изменять спектр флуоресценции в зависимости от окружающей среды. Поскольку конформация белка изменяется во время связывания лиганда, локальное окружение красителя также будет изменено, что повлечет за собой изменения в спектрах эмиссии и возбуждения флуоресценции. С их помощью возможно отслеживать различные состояния белков и проверять, взаимодействуют ли исследуемые белки с предполагаемыми лигандами.

Целью данной работы является поиск сольватохромных флуоресцентных красителей и проверка их пригодности для определения конформационного состояния рецептора. Так как лиганды меняют конформацию рецептора при взаимодействии, то такие красители позволят находить новые лиганды и определять, в каком состоянии находится белок в конкретный момент времени. Мы исследовали 2 красителя, основанные на хромофорном ядре GFP, которые ковалентно связываются с цистеинами в белке с помощью малеимид-тиолового взаимодействия. Мы показали связывание рецептора с красителем и изменения фотофизических свойств при добавлении к белку агониста и антагониста.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение # 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).



РЕАЛИЗАЦИЯ ЭФФЕКТА СВИДЕТЕЛЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ УЧАСТИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

Бугрова Ю.С., Горохова А.А., Пескова Н.Н., Балалаева И.В.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

yla.bugrova@yandex.ru

Эффект свидетеля представляет собой процесс, при котором клетки, подвергшиеся физическому или химическому стрессу, могут посылать сигналы соседним, не подвергшимся воздействию клеткам. Возможность проявления и механизмы эффекта свидетеля при фотодинамической терапии (ФДТ) в настоящее время малоизучены. ФДТ базируется на запуске окислительного стресса в клетке посредством образования активных форм кислорода (АФК) в фотохимической реакции с участием фотоактивных красителей – фотосенсибилизаторов (ФС). Исследования последних лет показывают, что пероксид водорода, образующийся в ходе таких реакций, помимо повреждающего воздействия может рассматриваться как сигнальная молекула. Целью данной работы стало проанализировать продукцию пероксида водорода в клетках-свидетелях при локальном фотодинамическом воздействии.

Объектом исследования выступала клеточная линия эпидермоидной карциномы человека A431-HuPer-cyto, экспрессирующая в цитоплазме клеток чувствительный к H_2O_2 генетически-кодированный флуоресцентный сенсор HuPer. Для количественной оценки содержания H_2O_2 использовали ратиометрический индекс I_{488}/I_{405} , рассчитываемый как отношение интенсивностей флуоресценции окисленной и восстановленной формы белка HuPer при возбуждении на 488 и 405 нм, соответственно. Регистрацию флуоресценции осуществляли в диапазоне 500-560 нм. В качестве фотосенсибилизатора использовали фотосенс (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК») – смесь натриевых солей сульфированного фталоцианина алюминия. Изображение клеток получали с помощью системы лазерной сканирующей конфокальной микроскопии Axio Observer Z1 LSM-710 (Carl Zeiss, Германия). Локальное фотодинамическое воздействие осуществляли путем облучения единичной клетки через объектив микроскопа светом с длиной волны 633 нм в дозах 50-150 Дж/см².

Проведённые исследования по облучению единичной клетки показали повышение уровня H_2O_2 , как у облучённой клетки, так и клеток-свидетелей. Показано, что на 10-15 минуте после фотодинамического воздействия происходит значительное увеличение I_{488}/I_{405} как для облучённой, так и для клеток-свидетелей, которое продолжается в течение 90 минут, причём ответ напрямую зависит от удалённости этих клеток от облучённой. При добавлении в среду каталазы после фотодинамического воздействия регистрировали ответ лишь облучённой клетки, без регистрации ответа свидетелей. Это позволяет предположить возможное участие H_2O_2 в качестве сигнальной молекулы при инициации эффекта свидетеля в случае локального фотодинамического воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке НЦМУ «Центр фотоники» (соглашение с Министерством науки и высшего образования РФ № 075-15-2020-927).



ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНСПОРТА СУБЪЕДИНИЦЫ ТЕЛОМЕРАЗЫ TERT В МИТОХОНДРИИ

Буркатовский Д.С., Богородский А.О., Маслов И.В.

ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

burkatovskiy.ds@phystech.edu

Теломераза – это рибонуклеопротеин, присутствующий в эукариотических клетках. Большая его часть находится в ядре, где он выполняет функцию по удлинению теломер на хромосомах. Однако, это не единственная функция теломеразы. Известно, что TERT – белковая субъединица теломеразы, присутствует также и в митохондриях клетки. Более того, при окислительном стрессе концентрация TERT в митохондриях повышается. Показано, что TERT выполняет в них функцию по защите митохондриальной ДНК.

В то же время, механизм транспорта TERT в митохондрии остается неизвестным. Транспортная машинерия митохондрий (TIM-TOM комплекс) плохо приспособлена для транспорта крупных белков – таких как TERT. Мы рассматриваем две основные гипотезы транспорта TERT. Согласно первой, созревший TERT перемещается в митохондрии из ядра, подвергаясь рефолдингу в процессе. Согласно второй, при окислительном стрессе белок TERT синтезируется в митохондрии клеткой котрансляционно.

Целью нашей работы было определить происхождение TERT в митохондриях при окислительном стрессе. Для этого был проведен ряд экспериментов с использованием методов флуоресцентной микроскопии на живых трансфицированных клетках. Результаты экспериментов свидетельствуют в пользу отсутствия транспорта TERT из ядра в митохондрии при окислительном стрессе.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ВОЗБУЖДЕНИЯ И ТОРМОЖЕНИЯ КЛЕТОК МЕСТА С ПОМОЩЬЮ ЭВОЛЮЦИОННОГО АЛГОРИТМА

Вандышев Г.К.^{1,2}, Мысин И.Е.¹

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино Россия;

²ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

vandyshov.gk@phystech.edu

Клетки места – это нейроны гиппокампа, кодирующие пространство у млекопитающих. Хотя нейроны гиппокампа могут кодировать время, запахи, новизну или образы людей именно пространственный памяти изучается активнее других. Координация обработки и передачи информации между областями гиппокампа осуществляется с помощью гамма (25-120 Гц) и тета-ритма (4-12 Гц). Почти все нейроны гиппокампа и энторинальной коры имеют фазу тета-ритма, когда вероятность их разряда максимальна. Пирамидные нейроны поля CA1 вне их поля места разряжаются редкими импульсами преимущественно на минимуме тета-волны,



однако при прохождении животного в поле места их частота увеличивается, а фаза разрядов смещается с восходящей фазы тета-ритма на нисходящую. Это явление получило название фазовой прецессии.

Экспериментально известно, что возбуждение клетки места при забегании животного в поле места обеспечивается входом от энторинальной коры (ЭК), а при выбегании главная роль в поддержании импульсной активности переходит к входу от поля СА3. При наложении этих двух осциллирующих сигналов, возникает муаровый эффект, который обеспечивает осцилляции большей частоты, которые и обеспечивают сдвиг по фазе. Данная гипотеза основывается на повышении возбуждения пирамидного нейрона. Роль торможения, которое обеспечивается интернейронами поля СА1, мало изучена.

В данной работе применяется модельный подход для изучения структуры возбуждения и торможения, при которой возникает фазовая прецессия. Моделировался пирамидный нейрон поля СА1, а также возбуждающие и тормозящие входы, которым соответствовали энторинальная кора, полю СА3 и 7 видов интернейронов: PV и ССК корзинчатые, OLM, Ivy, нейроглиаформные, дендритные и аксо-аксональные клетки. Интернейроны, перечисленных типов, наиболее исследованы и составляют более 70% от всех интернейронов поля СА1. Все входы имели свои веса, которые впоследствии оптимизировались с помощью эволюционного алгоритма так, чтобы поток импульсов пирамидного нейрона совпадал с целевым. Каждый вход моделировался произведением функций фон Мизеса и Гаусса. Поэтому оптимизировалось 3 параметра для каждого из 9 входов: веса, положение максимума входа относительно центра поля места и квадратичное отклонение гауссианы.

В результате оптимизации была найдена конфигурация возбуждающих и тормозных нейронов. Ей соответствует доминирование возбуждающих сигналов и равномерное торможение. Среди интернейронов наибольший вклад в торможение пирамидных клеток вносят аксо-аксональные нейроны. Полученные зависимости соответствуют экспериментальным данным.

ИССЛЕДОВАНИЕ GPCR В НАНОДИСКАХ, ЦИРКУЛЯРИЗОВАННЫХ С ПОМОЩЬЮ ИНТЕИНА

Василенко Л.М., Хорн П.А., Маркеева Е.А., Мишин А.В.

ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

vasilenko.lm@phystech.edu

Клеточная мембрана – это многокомпонентная система, в которую включены мембранные белки. Несмотря на сложность строения мембраны, крайне важно уметь ее воспроизводить при изучении мембранных белков в растворе, вне их нативного окружения. Решением являются мембрано-моделирующие системы (ММС), к которым относятся мицеллы, амфиполи, нанодиски, липодиски, липосомы. Разнообразие ММС обусловлено широким кругом задач, стоящих перед исследователями мембранных белков, а появление новых ММС – необходимостью решать недостатки существующих. Так, разработка нанодисков на основе полимеров стерин-малеиновой кислоты позволила выделять мембранные белки из мембран, минуя стадию их солюбилизации в детергент, при которой возможна потеря функциональных свойств белка.



К новым ММС можно отнести циркуляризованные нанодиски. Они стабилизируют исследуемый мембранный белок и формируют структуру фиксированного размера за счет ковалентной сшивки концов образующего нанодиск каркасного белка. Впервые такая сшивка была реализована с использованием транспептидазы сортазы А. Однако модификация каркасного белка *in vitro* сопряжена с рядом трудностей. Для их решения была предложена сшивка каркасного белка посредством интеина. Интеин – внутренняя часть полипептида, удаляемая в результате белкового сплайсинга с последующей сшивкой освободившихся аминокислотных остатков. Для циркуляризации каркасного белка в его генетическую последовательность на оба конца вводится по фрагменту от целого интеина. Такая модификация позволяет точно и эффективно сшить концы каркасного белка *in vivo* во время экспрессии в *E. coli*, тем самым уменьшая время, необходимое для получения циркуляризованных нанодисков (intcMSP).

На данный момент intcMSP нанодиски были использованы для исследования мембранных белков ompX и hVDAC-1 методом ЯМР-спектроскопии. Также методом крио-электронной микроскопии была получена пространственная структура белкового комплекса Pex14p(M51L)/Pex17p, встроенного в эти нанодиски. Линейка методов, с помощью которых можно исследовать мембранные белки, встроенных в intcMSP, может быть расширена благодаря наличию цистеина в последовательности циркуляризованного каркасного белка, который можно модифицировать с помощью флуоресцентных красителей. Целью этой работы является исследование важного семейства мембранных белков – рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR), с применением циркуляризованных посредством интеина нанодисков.

Работа выполнена при поддержке Министерство науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).

МОДИФИЦИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ КРАЙНЕ ВЫСОКИХ ЧАСТОТ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ЭПИРУБИЦИНУ

**Ветрова О.С.¹, Букина Ю.О.¹, Рысцов Г.К.², Земскова М.Ю.²,
Щербатюк Т.Г.^{1,3}, Гапеев А.Б.⁴**

¹ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия;

²ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН,
Пушкино, Россия;

³ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии
Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

⁴ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

Olesja.wetrowa1999@gmail.com

В середине 20-го века было обнаружено, что облучение живых организмов электромагнитным излучением крайне высоких частот (ЭМИ КВЧ) низкой интенсивности с определенными параметрами может приводить к выраженным биологическим и терапевтическим эффектам. Результаты исследования биоэффектов ЭМИ КВЧ при лечении онкологических заболеваний показывают, что возможно применение как монотерапии ЭМИ



КВЧ, так и комбинирование облучения с противоопухолевыми препаратами. В связи с этим актуальным является исследование модифицирующего действия ЭМИ КВЧ на чувствительность опухолевых клеток к цитостатикам.

Эксперименты выполнены с использованием линий клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и MCF-7, представляющих собой соответственно модели лекарственно-устойчивой, высоко агрессивной, и менее агрессивной, чувствительной к химиотерапии форм заболевания, а также плюрипотентных стволовых клеток. Источником ЭМИ КВЧ служил высокочастотный генератор Г4-141 со следующими параметрами: несущая частота 42.2 ГГц, интенсивность 100 мкВт/см², экспозиция 20 мин, импульсная модуляция меандром с частотой 1 Гц. Уровень повреждений ДНК в клетках оценивали с помощью щелочного варианта метода «ДНК-комет» по процентному содержанию ДНК в «хвосте кометы» (%TDNA). Статистический анализ данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

Для клеточной линии MDA-MB-231 при концентрации эпирубина 1 мкг/мл не наблюдалось модифицирующего действия ЭМИ КВЧ. Облучение клеток перед применением препарата в концентрациях 10 и 100 мкг/мл увеличивало уровень повреждений ДНК на 32% и 24% соответственно. Для линии клеток MCF-7 при концентрациях цитостатика 10 и 100 мкг/мл показано увеличение %TDNA при использовании ЭМИ КВЧ на 37% и 25% соответственно. Для плюрипотентных стволовых клеток наблюдался обратный эффект – снижение уровня повреждений ДНК при использовании ЭМИ КВЧ. Для концентрации 1 мкг/мл – на 20%, 10 мкг/мл – на 21%, 100 мкг/мл – на 6%.

Таким образом, ЭМИ КВЧ оказывает модифицирующее действие на чувствительность клеток к эпирубину, повышая уровень повреждений ДНК в опухолевых клетках и снижая чувствительность к цитостатику стволовых клеток. Наибольший эффект наблюдается при концентрациях цитостатика 10 и 100 мкг/мл. Полученные результаты позволяют рассматривать ЭМИ КВЧ в качестве перспективного агента для использования в медицине с целью увеличения эффективности противоопухолевых препаратов и снижения негативного влияния на нормальные клетки организма.

АЛГОРИТМ ПОСТРОЕНИЯ И СРАВНЕНИЯ СЕТЕЙ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ АНАЛИЗА ТРАЕКТОРИЙ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ БЕЛКОВ

Власенкова Р.А.¹, Козлова А.С.¹, Богданов М.В.^{1,2}, Акберова Н.И.¹

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия;

²Научный центр здоровья Техасского университета в Хьюстоне, Хьюстон, США

r.mukhamadeeva@yandex.ru

Анализ и сравнение сетей взаимодействия аминокислотных остатков в пространственных структурах белков при проведении молекулярной динамики позволяет исследовать вклад определенных аминокислот как в структурную устойчивость, так и в конформационную подвижность белков. При этом необходимо учитывать такие параметры аминокислот как консервативность, заряд, гидрофобность и другие свойства, обусловленные их физикой и химией.



Для учета всего комплекса параметров аминокислот при построении сетей в работе разработан алгоритм определения формулы веса вершины графа. На первом этапе построены взвешенные графы, вес в которых определялся одним из следующих параметров – процент времени нахождения аминокислоты в запрещенных зонах, процент времени взаимодействия аминокислоты с водой, RMSF (root mean square fluctuation), консервативность аминокислоты, заряд, гидрофобность. Для контроля был также построен невзвешенный граф. Для каждого графа были определены следующие параметры вершин – степень вершины, степень посредничества, степень близости, центральность. Параметры вершин взвешенных графов были сравнены с аналогичными параметрами вершин контрольного невзвешенного графа с помощью теста Краскела-Уоллиса с попарным тестом Уилкоксона с поправкой на множественность сравнений. Коэффициент для каждого параметра аминокислот был рассчитан на основе уровня значимости, полученного при сравнении. Коэффициенты и значения параметров аминокислот определяют формулу веса вершины.

Сравнение сетей взаимодействия аминокислот производилось на взвешенных графах, для вершин использовались веса, рассчитанные на предыдущем этапе анализа. Для сравнения были получены матрицы смежности с учётом полученных весов. На основе матриц смежности вершины выполнена кластеризация методом распространения близости. Оценка сходства каждого кластера определялась как среднее значение максимального сходства для каждой пары вершин между двумя графами. Оценка сходства графов рассчитывалась как медиана оценок сходства каждого кластера. Процедуры определения формулы веса вершины графов и сравнение графов были полностью автоматизированы.

Данный алгоритм позволил провести сравнительный анализ важных для структуры аминокислот транспортера D-ксилозы *E. coli* при равновесной молекулярной динамике в разном липидном окружении.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ Т-ХЕЛПЕРНЫХ КЛЕТОК ПО ДАННЫМ ЦИТОМЕТРИИ КРОВИ

Воронина М.Д.¹, Атауллаханов Р.И.²

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

voronina.md@phystech.edu

CD4⁺ Т-клетки (Т-хелперы) составляют второе звено адаптивного Т-клеточного иммунитета и необходимы для большинства иммунных реакций. Т-хелперные клетки активируются при представлении антигенов и обладают способностью дифференцироваться в клеточные подтипы. При активации вспомогательные Т-клетки размножаются и выделяют цитокины, которые вызывают макрофаги и цитотоксические Т-клетки в инфицированный участок.



Исследования проточной цитометрии используются для выявления и количественного определения иммунных клеток и характеристики гематологических злокачественных новообразований. Анализ данных трех-четырёх параметрической иммунофлуоресценции не вызывает затруднений, но он усложняется при исследовании увеличивающегося количества клеточных маркеров, что увеличивает вариабельность и приводит к проблемам воспроизводимости.

В данной работе был усовершенствован подход к многопараметрическому типированию Т-клеток периферической крови, применены подходы машинного обучения, разработаны этапы проверки качества сырых данных цитофлуориметрии, на примере обработки данных цитометрии крови когорт здоровых доноров и онкологических больных показана перспективность данного метода для диагностики.

Литература.

1. Tay R.E., Richardson E.K., Toh H.C. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms // *Cancer Gene Therapy*. Springer Nature. 2021. V. 28. P. 5.
2. Cheung M., Campbell J.J., Whitby L., Thomas R.J., Braybrook J., Petzing J. Current trends in flow cytometry automated data analysis software // *Cytometry Part A*. Wiley-Liss Inc. 2021. V. 99. P. 1007.
3. Ohue Y., Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? // *Cancer Science*. Blackwell Publishing Ltd. 2019. V. 110. P. 2080.
4. Chen C., Gao F.H. Th17 cells paradoxical roles in melanoma and potential application in immunotherapy // *Front Immunol*. 2019. V. 10. P. 187.
5. Xu H.M. Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2014. V. 13. P. 482.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА НЕЙРОНОВ, СОДЕРЖАЩИХ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫЕ АМРА-РЕЦЕПТОРЫ

**Гайдин С.Г.¹, Зинченко В.П.¹, Кайрат Б.К.², Косенков А.М.¹,
Ларюшкин Д.П.^{1,3}, Майоров С.А.¹**

¹ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пушчино, Россия;

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан;

³ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушчино, Россия

ser-gajdin@yandex.ru

Кальций-проницаемые АМРА-рецепторы (СР-АМРА-рецепторы) играют важную роль в синаптической пластичности, нейро- и синаптогенезе. Основной проблемой при изучении функций СР-АМРА-рецепторов является методическая трудность в идентификации нейронов их экспрессирующих.

Для этих целей, как правило, применяется иммуногистохимическое окрашивание с использованием антител к GluA1 и GluA2 субъединицам или электрофизиологические методы исследований (определение вольт-амперных характеристик при активации ионотропных глутаматных рецепторов), однако оба этих подхода имеют ряд недостатков. Электрофизиологические методы дают информацию о наличии СР-АМРА-рецепторов в



единичном нейроне, тогда как шанс обнаружения такого нейрона невелик. В свою очередь иммуногистохимическое окрашивание позволяет делать вывод о содержании СР-АМРА-рецепторов в больших популяциях нейронов, тем не менее этот метод позволяет производить оценку лишь в фиксированных препаратах. Более того, так как кальций-проницаемыми могут быть не только рецепторы, не содержащие GluA2-субъединицу, но также и рецепторы, содержащие неотредактированную в Q/R сайте GluA2 субъединицу (GluA2(Q)), которую невозможно отличить от отредактированной GluA2 субъединицы (GluA2(R)) при использовании антител.

Нами был предложен метод витальной идентификации нейронов, содержащих СР-АМРА-рецепторы, в основе которого лежит оценка динамики изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в ответ на аппликацию селективных агонистов АМРА-рецепторов в присутствии определённого набора антагонистов ионотропных рецепторов глутамата и блокаторов потенциал-зависимых кальциевых каналов. В качестве объекта исследований использовались смешанные нейроглиальные культуры гиппокампа новорождённых крыс линии Sprague-Dawley. Используя описанный подход в сочетании с иммуноцитохимическим окрашиванием, электрофизиологическими измерениями и микрофлуориметрическими измерениями различных физиологических параметров клеток (внутриклеточный рН, изменения внутриклеточной концентрации Na^+ , потенциал мембраны митохондрий) мы изучили молекулярные и биофизические особенности нейронов, содержащих СР-АМРА-рецепторы, охарактеризовали их устойчивость в моделях различных патологий, включая индуцированную эпилептиформную активность и глутаматную эксайтотоксичность. Предложенный нами подход к визуализации нейронов, содержащих СР-АМРА-рецепторы, позволяет преодолеть ряд ограничений, накладываемых традиционно используемыми для этих целей методами.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБК РАН (регистрационный номер ЦИТиС АААА-А20-120101390067-0).

СТРУКТУРА ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ LOV-ДОМЕННОГО БЕЛКА ИЗ *CHLOROFLEXUS ISLANDICUS* С ЕСТЕСТВЕННЫМ КРАСНЫМ СМЕЩЕНИЕМ

**Гончаров И., Смоленцева А., Семенов О., Натаров И., Назаренко В.,
Юденко А., Ремеева А., Гушин И.**

ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

ivan.goncharov@phystech.edu

Флуоресцентные белки являются популярным инструментом для визуализации и детального понимания различных структур и процессов в живых клетках с высоким пространственным и временным разрешением. Наиболее часто для этого используются GFP-подобные белки, однако одним из их основных недостатков, который не может быть устранен генетическими модификациями, является обязательное требование к наличию молекулярного кислорода для созревания хромофора. В качестве альтернативы GFP-подобным белкам разрабатывается новый класс флавин-связывающих флуоресцентных белков (FbFP),



основывающихся на так называемых Light Oxygen Voltage (LOV) доменах растительных и микробных фоторецепторов [1]. Помимо флуоресцентной микроскопии, LOV домены используются для генерации активных форм кислорода под действием света [2,3], а также в оптогенетике, для управления конформацией, ассоциацией или диссоциацией целевых белков с помощью света [4-6].

Особый интерес представляют LOV домены из термофильных бактерий, так как они, как правило, обладают повышенной термостабильностью. Так, флуоресцентный белок CagFbFP из *Chloroflexus aggregans* обладает повышенной температурой плавления, и обладает менее выраженными недостатками, характерными флуоресцентным меткам на основе LOV доменов [7].

Недавно из гейзера Строккюр была выделена термофильная бактерия *Chloroflexus islandicus*, содержащая LOV доменный белок [8], который по сравнению с аналогичным белком из *Chloroflexus aggregans* имеет такую же длину (913 аминокислот) и последовательность, идентичную на 70%, причем идентичность самого LOV домена – 81%. Нами был изучен его флуоресцентный вариант, получивший название CisFbFP [9], в котором была произведена замена фотоактивного цистеина на аланин, аналогичная той, что была в случае CagFbFP. В докладе будут представлены основные различия между CisFbFP и другими доменами FbFP и LOV. Полученные знания могут быть полезны для создания уникальных и полезных инструментов флуоресцентной микроскопии, а также иных инструментов на базе LOV доменных белков.

НИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА В ПРООКСИДАНТНЫХ ПРОЦЕССАХ, ПРОХОДЯЩИХ С УЧАСТИЕМ ГЕМОПРОТЕИНОВ

Грачев Д.И.^{1,2}, Шумаев К.Б.^{2,3}, Рууге Э.К.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Физический факультет, Москва, Россия;

²ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва, Россия;

³Институт Биохимии им. А.Н. Баха, ФГУ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

di.grachev@physics.msu.ru

Известно, что в живых системах оксид азота (NO) выполняет множество функций, например, он может выступать в качестве как прооксиданта, так и антиоксиданта. Однако, до сих пор не вполне выяснены механизмы такого двойственного действия NO, в том числе в составе нитрозильных комплексов железа.

Нитрозильные комплексы гемового железа, такие как нитрозилгемоглобин (HbNO), и динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с тиольными лигандами описаны во многих исследованиях. Особый интерес представляет взаимодействие этих физиологических форм NO с активными формами кислорода, азота и галогенов, которые участвуют в воспалительных реакциях и в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

Целью нашей работы являлось получение новых данных о взаимодействии нитрозильных комплексов гемоглобина с активными формами кислорода, азота и галогенов, в частности пероксинитритом и гипохлоритом.



Комплексы оксида азота с гемоглобином исследовались методом спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в модельных системах с бычьим гемоглобином или человеческими эритроцитами. Образование свободных радикалов в системе с гемопротеинами (цитохромом с и гемоглобином) и гидропероксидом трет-бутила (t-BOOH) оценивалось также методом спектроскопии ЭПР с использованием спиновой ловушки DEPMPO (5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пирролин-N-оксид).

Нами было показано, что пероксинитрит, как и гипохлорит, количественно разрушает ДНКЖ, связанные с остатками цистеина гемоглобина, причем в этих случаях не происходит нитрозилирования железа гемовой группы. В других экспериментах было изучено участие гемопротеинов и их нитрозильных комплексов в перекисном окислении липидов. Гемоглобиновые ДНКЖ и HbNO существенно снижали уровень органических свободных радикалов, возникающих в реакциях t-BOOH с гемовым железом гемоглобина. Аналогичным антиоксидантным действием обладали глутатионовые ДНКЖ в системе, содержащей t-BOOH и цитохром с.

В результате выполнения данной работы мы пришли к следующим выводам:

– разрушение ДНКЖ при окислительном и нитрозативном стрессе может являться элементом регуляции метаболизма NO, а также влиять на сигнальную функцию этой молекулы;

– различные ДНКЖ и HbNO, обладают антиоксидантным и антирадикальным действием, перехватывая прооксиданты.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОНСТАНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ GPCR С ЛИГАНДАМИ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОМАСШТАБНОГО ТЕРМОФОРЕЗА

Дашевский Д.Е., Лугинина А.П.

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний,
ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский
университет), Долгопрудный, Россия

dashevskij.de@phystech.edu

Рецепторы, сопряжённые с G-белком (GPCR), участвуют в большинстве физиологических процессов человеческого организма, из-за чего являются основными мишенями для новых лекарственных препаратов. Именно поэтому исследование взаимодействия GPCR с лигандами – актуальная биомедицинская задача.

Для измерения одного из параметров взаимодействия, константы связывания, может быть применён метод микромасштабного термофореза (Microscale Thermophoresis, MST). Подход основан на измерении подвижности молекул, меченых флуоресцентным красителем, в температурном градиенте. Связывание с лигандами вызывает изменение подвижности комплекса, что фиксируется прибором по локальной вариации интенсивности флуоресценции. MST выгодно отличается от других способов измерения константы связывания, тем что позволяет значительно облегчить пробоподготовку, сократить время проведения эксперимента и количество затрачиваемого образца, а также не требует работы с радиоактивными лигандами. Несмотря на удобство метода MST, необходима его адаптация применительно к рецепторам, сопряженным с G-белком.



В нашем исследовании для создания химического окружения рецептора, приближенного к условиям в мембране клетки, GPCR встраивался в нанодиски. Нанодиски представляют собой бислой липидов, который окружен двумя белками мембранного каркаса (Membrane Scaffold Protein, MSP). Для того, чтобы исключить влияние флуоресцентного красителя на функциональность рецептора, места посадки для малеимидного красителя были размещены на нанодисках, благодаря точечным мутациям глицина на цистеин в аминокислотную последовательность MSP. Также был разработан метод, использующий мечение флуоресцентным красителем по bхHis последовательности рецептора. Были оптимизированы протоколы сборки нанодисков и мечения MSP.

При помощи метода MST и адаптированных для этого метода нанодисков в нашей работе решается задача разработки технологии для быстрого и точного измерения константы связывания GPCR с лигандами. Данная технология может быть применена для структурно-функциональных исследований рецепторов.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ УЧАСТКОВ КОНЦЕВЫХ ПОВТОРОВ ЭНДОГЕННЫХ РЕТРОВИРУСОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЯЩЕРИЦ

Ермакова Е.А.¹, Глазко В.И.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия;

²ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева, пос. Родники, Россия

ermakovaelizz@gmail.com

Ящерицы широко применяются в качестве биоиндикаторов природных сред для выявления состояния популяции. В качестве инструмента для исследования структуры популяции, могут применяться участки эндогенных ретровирусов растений, которые уже использовались для оценки особенностей пород сельскохозяйственных животных [2].

Полилокусное генотипирование двух популяций прыткой ящерицы с использованием длинных концевых повторов эндогенных ретровирусов (LTR-SIRE 1 и Sabrina 111) [1] показало, что половая дифференциация по генетической структуре различается в зависимости от местообитания. Было решено узнать, геномы каких видов ящериц содержатся в базах данных GenBank и возможно ли, используя элементы ретровирусов Sabrina и LTR-SIRE1, проводить подобные исследования с использованием этих видов в местах их обитания. Поиск участков в геномах ящериц из базы данных репрезентативных геномов проводился с помощью программы BLAST. Данные заносились в таблицу Microsoft Excel, где была произведена сортировка результатов и последующий анализ. В результате исследования выявлено шесть видов ящериц, содержащих в своих геномах участки вышеуказанных мобильных элементов: *Podarcis muralis*, *Lacerta agilis*, *Zootoca vivipara*, *Anolis carolinensis*, *Gekko japonicus*, *Pogona vitticeps*.

При оценивании популяций конкретных видов следует учитывать, что участки гомологии к ретротранспозонам LTR-SIRE1 и LTR-Sabrina111 в геномах ящериц отличаются степенью полиморфности. Таким образом, на моделях еще пяти видов ящериц методом полилокусного генотипирования с использованием участков эндогенных ретровирусов возможно проводить исследования для оценки изменчивости видов, экологического состояния их местообитаний и приспособления к ним.



СБОРКА И АННОТАЦИЯ ГЕНОМА *BOECHERA FALCATA*

Зилов Д.С.¹, Комиссаров А.С.¹, Брюхин В.Б.²

¹ФГАОУ ВО Университет ИТМО, Лаборатория прикладной геномики,
Химико-биологический кластер, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГАОУ ВО Университет ИТМО, Лаборатория геномики растений,
Химико-биологический кластер, Санкт-Петербург, Россия
zilov.d@gmail.com

Нами был собран и проаннотирован геном растения *Boechera falcata*. Растения данного рода имеют отличительную особенность – способность к апомиксису (бесполому размножению). Для структурной и функциональной аннотации был разработан конвейер PANIMAN. Полученная сборка и аннотация будут использоваться для дальнейшего сравнительного анализа апомиктических растений и определения причин и механизмов бесполого размножения.

Род *Boechera* sp. – уникальное растение из семейства Brassicaceae, способное размножаться апомиксисом (без полового размножения). Этот род хорошо подходит для изучения апомиксиса, поскольку он (1) находится в близком родстве с модельным растением *Arabidopsis thaliana* (L.), геном которого полностью отсекувенирован, (2) имеет небольшой размер, (3) апомиксис происходит на диплоидном уровне, что удобно для анализа геномных данных. Наша цель – получить больше данных для будущего сравнительного анализа геномов. В данной работе было проведено секвенирование, сборка и аннотация генома *Boechera falcata*.

Для сборки генома было проведено секвенирование Illumina. Покрытие чтений и плоидность оценивали с помощью GenomeScore и SmurdgePlot соответственно. Сборка генома была выполнена с помощью программы platanus-allele. Для аннотации генома был разработан конвейер PANIMAN. Инструмент автоматически выполняет три этапа: 1) мягкая маскировка повторов с помощью RepeatModeler; 2) предсказание генов в четырех режимах с помощью BRAKER; 3) аннотация функциональных генов с помощью EggNOG-mapper.

Результаты работы:

- были получены прочтения секвенирования с покрытием генома равным x243;
- оценка плоидности подтвердила, что объект – диплоид;
- размер сборки генома – 179 млн.н.п.;
- N50 генома – 22452 н.п.;
- собранные однокопийные гены BUSCO – 95%;
- предсказано 33079 генов, из них функционально проаннотировано 29649 генов.

Выводы. Сборка данного генома является частью большого проекта. На текущий год запланировано секвенирование двух геномов рода *Boechera*, которые также будут собраны и проаннотированы. Полученный геном будет использоваться для дальнейшего сравнительного анализа апомиктических растений для определения причин и механизмов бесполого размножения растений.



МИКРОМАСШТАБНЫЙ ТЕРМОФОРЕЗ В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМОВ P450 С АЗОЛЬНЫМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

**Капанов И.А.¹, Карпова М.А.², Загрядская Ю.А.¹, Охрименко И.С.¹, Варакса Т.С.³,
Гилеп А.А.^{3,4}, Струшкевич Н.В.², Борщевский В.И.¹**

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

²АНОО ВО Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия;

³ГНУ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь;

⁴ФГБНУ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

kapranov.ia@phystech.edu

Цитохромы P450 – широко распространенные белки, участвующие в синтезе и метаболизме стероидов, ненасыщенных жирных кислот и фенольных производных, а также задействованные в выведении из клетки чужеродных веществ [1]. Ранее было показано, что соединения азольного ряда, ингибирующие активность цитохромов P450, подавляют рост *Mycobacterium tuberculosis* – возбудителя туберкулеза, одного из самых смертоносных заболеваний [2]. В предыдущих работах мы показали, что CYP124, CYP125 и CYP142 могут связываться и метаболизировать ряд иммуноактивных оксистеролов человека *in vitro* [3], а также участие CYP124 в метаболизме противотуберкулезного соединения, находящегося на стадии клинических испытаний [4]. Таким образом, ингибирование цитохромов P450 является перспективной стратегией для разработки новых противотуберкулезных препаратов.

Существующие методы исследования взаимодействия цитохромов P450 с лигандами (спектральное титрование и поверхностный плазмонный резонанс) имеют ряд ограничений. В настоящей работе мы использовали альтернативный метод – микромасштабный термофорез (MST), который не использовался ранее для изучения цитохромов P450.

Измерения, для которых микобактериальный цитохром CYP124 был флуоресцентно помечен красителем Cy3-HNS, были проведены на приборе Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). Полученные кривые MST были использованы для расчета констант диссоциации CYP124 с рядом азольных соединений: эконазолом, кетоконазолом, итраконазолом и миконазолом. Полученные значения констант сравнимы с таковыми, рассчитанными из спектрофотометрического титрования.

Таким образом, MST может быть использован для изучения связывания цитохромов семейства P450 с низкомолекулярными лигандами, особенно в тех случаях, когда классические подходы неприменимы.

Данная работа была поддержана совместным исследовательским грантом Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (Б20Р-061) и Российского фонда фундаментальных исследований (20-54-00005).



АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ МЕМБРАННОГО ОКРУЖЕНИЯ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИЮ ТРАНСМЕМБРАННОГО БЕЛКА – КСИЛОЗНОГО ТРАНСПОРТЕРА XYLE

Козлова А.С., Акберова Н.И.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

kozlovanastasiaser@gmail.com

Метод молекулярной динамики и докинг могут помочь прогнозировать эффект модификации и изменения микроокружения белка на его структуру и функцию. В данной работе разработан метод, который позволяет проводить анализ влияния окружения на структуру и функцию трансмембранных белков на примере транспортера ксилозы Xyle в разных мембранных окружениях фосфатидилэтаноламин (POPE) и фосфатидилсерин (POPG).

Анализ включает в себя проведение молекулярной динамики, выбор наиболее репрезентативных структур, проведение молекулярного докинга рецептор-лиганд и поиск наиболее вероятных мест связывания. Получение и анализ исследуемых параметров: структуры белка в ходе молекулярной динамики, сравнительный анализ поведения аминокислот в ходе молекулярной динамики, параметров аминокислот полученных из последовательности. Системы для проведения молекулярной динамики подготовлены с использованием CHARMM-GUI, молекулярная динамика проведена при помощи NAMD. Анализ влияния изменения состава мембраны проведен на основе анализа изменения с течением времени и на основе усредненных параметров аминокислот. Параметры аминокислот и изменение параметров всего белка в ходе молекулярной динамики были получены при помощи программ VMD и Bio3D R. Изменение функция белка оценивалась на основе изменения аминокислот связывающиеся с лигандами и средства рецептора к лигандам. Докинг проводился ко всей поверхности белка доступной для растворителя в ходе молекулярной динамики с использованием AutoDock. Наиболее вероятные положения лигандов определялись методом сходимости. В качестве исходной структуры для данного эксперимента была выбрана структура ксилозного транспортера (uniprot id P0AGF4, pdb id 4GBY). Эффект влияния на функцию определялся анализом связывания с природным лигандом d-ксилозой и ингибитором d-глюкозой.

Анализ влияния модификации и изменения микроокружения белка позволит прогнозировать, какой эффект может иметь то или иное липидное окружение на структуру белка и на его функциональную активность на основе разницы в конформациях и связывания с лигандами.

Работа выполнена за счет средств Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).



ИЗУЧЕНИЕ КОНФОРМАЦИОННОГО ПЕРЕХОДА ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА H3N2 МЕТОДАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Коннов С.И.^{1,2}, Кирилин Е.М.^{1,2}, Швядас В.К.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия;

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Научно-исследовательский вычислительный центр, Москва, Россия

simon.konnov@gmail.com

Для заражения клетки-хозяина вирусу гриппа необходим белок слияния – гемагглютинин. Изменение структуры одного из доменов гемагглютинина из компактного свернутого состояния в линейную форму является ключевым для заражения. Фундаментальной задачей является идентификация динамики структурных изменений, сопровождающих процесс конформационной перестройки гемагглютинина.

В данной работе представлен подход к моделированию перестройки фрагмента центральной α -спиральной области (Gln34-Thr107) гемагглютинина вируса гриппа H3N2. Было проведено два моделирования с помощью метода метадинамики. В первом моделировании использовались две коллективные переменные: RMSD и GYRATION (тип ACYLINDRICITY, характеризующий отклонение от цилиндрической осевой симметрии). При моделировании перехода минимум энергии располагался диагонально в координатах RMSD/ACYLINDRICITY, что говорит о независимом выпрямлении трех субъединиц друг относительно друга. Поэтому дальнейшее моделирование разворачивания субъединиц проводилось поочередно, при этом структура уже выпрямленных областей удерживалась наложением дополнительных энергетических барьеров. Использовались две коллективные переменные: RMSD и ALPHABETA (характеризует схожесть торсионных углов остатков двух структур (Φ и Ψ)). Переход из стартового состояния первой субъединицы в область более высокого значения ALPHABETA и низкого RMSD происходит быстро одновременно со спирализацией. При моделировании второй субъединицы из-за образования гидрофобного ядра появляется минимум, соответствующий конечному развёрнутому состоянию двух субъединиц. При разворачивании третьей субъединицы гидрофобное ядро образуется между тремя симметричными α -спиралями и характеризуется максимальной стабилизацией.

Таким образом, в данной работе удалось восстановить основные этапы процесса конформационной перестройки гемагглютинина, характеризующейся независимым распрямлением субъединиц и образованием общего устойчивого гидрофобного ядра. Подобная схема моделирования перестройки α -спиралей в структуре гемагглютинина, который относится к классу I белков слияния, включающий также s-белок SARS-CoV-2, гликопротеины ВИЧ и др., может дать основу для дальнейшего анализа целого класса белков со схожим механизмом конформационных переходов, что открывает новые возможности для поиска активных молекул, способных предотвратить заражение еще на ранних этапах развития патогена.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-71-30003).



КЛЕТКИ ЛИНИИ НЕК293 КОДИРУЮТ ИНФОРМАЦИЮ ОБ
ИНТЕНСИВНОСТИ АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ СТИМУЛОВ
ПОСРЕДСТВОМ cAMP-, А НЕ Ca²⁺-СИГНАЛИЗАЦИИ

Кочкина Е.Н., Котова П.Д.

ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

kate-kochkina@yandex.ru

Норадреналин играет важную роль в регуляции широкого круга физиологических процессов и распознается клетками различных типов с помощью адренергических рецепторов, которые сопряжены с Ca²⁺- и cAMP-сигнализацией. Ранее мы показали, что в мезенхимных стромальных клетках (МСК) норадреналин инициирует Ca²⁺-сигналы, которые генерируются по принципу «всё или ничего», т.е. начиная с пороговой дозы амплитуда Ca²⁺-ответов не зависит от концентрации агониста. Такой характер ответа ставит вопрос о том, каким образом МСК кодируют информацию о величине поступившего адренергического стимула. Также неясно, насколько универсальным является такой тип клеточных ответов на агонисты.

В данной работе мы исследовали Ca²⁺- и cAMP-сигнализацию, инициируемые норадреналином в клетках НЕК293. Мониторинг цитозольных Ca²⁺ и cAMP проводили с помощью генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров GEM-GECO1 и Pink Flamingo, соответственно. В экспериментах использовали клетки НЕК293 через 24–48 ч после трансфекции соответствующими плазмидными векторами. Динамику cAMP и Ca²⁺ в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции встроенных сенсоров Pink Flamingo и GEM-GECO1, соответственно.

Нами было проанализировано 226 клеток, для которых была характерна флуоресценция, индуцированная экспрессией одновременно обоих флуоресцентных сенсоров. Из них в ответ на стимуляцию норадреналином 152 клетки (67%) генерировали исключительно cAMP-ответы, 25 клеток (11%) генерировали только Ca²⁺-ответы, а в 49 клетках (22%) наблюдалось увеличение уровня обоих вторичных медиаторов. То есть значительное большинство (89%) клеток НЕК293, чувствительных к норадреналину, генерировали cAMP-ответы, тогда как Ca²⁺-ответы наблюдались лишь в 33% субпопуляции. При этом Ca²⁺-ответы генерировались по принципу «всё или ничего», пороговая концентрация норадреналина для Ca²⁺-ответов составляла 1–5 мкМ. Дозозависимость же cAMP-ответов носила совершенно иной характер: амплитуда cAMP-ответов росла прямо пропорционально концентрации агониста, пороговая концентрация норадреналина для cAMP-ответов составляла 1–3 мкМ.

Тот факт, что амплитуда Ca²⁺-ответов на норадреналин остается неизменной при различных его концентрациях, а амплитуда cAMP-сигналов зависит от концентрации норадреналина, говорит о том, что информация о величине адренергического стимула кодируется скорее с помощью cAMP-, а не Ca²⁺-сигналов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-10068.



АСТАКСАНТИН УЛУЧШАЕТ ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЯ МОЗГА КРЫС С СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Крестинин Р.Р., Бабурина Ю.Л., Одинокова И.В., Сотникова Л.Д., Крестинина О.В.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

rkrestinin@bk.ru

Заболевания сердечно-сосудистой системы способны приводить к нарушению кровотока в артериях и уменьшать кровоснабжение мозга. Это может приводить к нарушению мозгового кровообращения, встречающееся не только у пожилых людей, но и у молодых и даже у детей. Митохондрии участвуют в этиологии различных заболеваний, таких как нейродегенеративные, сердечно-сосудистые заболевания и другие. Митохондрии играют ключевую роль в нормальном функционировании мозга и сердца, а также в патогенезе и развитии различных видов заболеваний. Астаксантин (АСТ) является каротиноидом ксантофиллом преимущественно морского происхождения, с антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Он обладает как липофильными, так и гидрофильными свойствами и используется в качестве обычного антиоксиданта или пищевой добавки, предназначенной для потребления человеком, животными и аквакультурой. АСТ может предотвращать митохондриальную дисфункцию путем проникновения и локализации в пределах митохондрий.

Для исследования использовали митохондрии мозга крыс (ММК), изолированные из четырех групп крыс. Первая была контрольная. Второй группе крыс вводили астаксантин перорально (150 мг/кг), крысам третьей группы делали инъекцию изопротеренола, чтобы вызвать сердечную недостаточность (100 мг/кг, дважды, инъекция), крысам четвертой группы вводили перорально астаксантин и делали инъекции изопротеренола. В результате проведенного исследования мы наблюдали, что у ММК третьей группы дыхательный контроль и Ca^{2+} ёмкость снижались, что говорит о том, что функциональное состояние ММК ухудшалось по действию изопротеренола, в то время как астаксантин улучшал функциональное состояние ММК увеличивая дыхательный контроль и Ca^{2+} ёмкость у крыс четвертой группы, блокируя действие изопротеренола.

Введение АСТ уменьшало содержание фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов и увеличивало уровни АНТ, субъединиц комплексов дыхательной цепи и субъединиц *c*, *b* и *a* АТФ-синтазы при сердечной недостаточности, что указывает на улучшение функционального состояния ММК, дыхания митохондрий и увеличение активностей комплексов дыхательной цепи и АТФ-синтазы. Поэтому, АСТ можно рассматривать как потенциальное терапевтическое средство для лечения патологических состояний, связанных с окислительными повреждениями и митохондриальной дисфункцией, вызванных сердечной недостаточностью.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00131, 20-015-00072.



ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОФИЗИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *IN VITRO* ГЛИКОКОНЬЮГАТОВ ХЛОРИНА E6 ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

**Крылова Л.В., Пескова Н.Н., Отвагин В.Ф., Кузьмина Н.С.,
Федоров А.Ю., Балалаева И.В.**

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

lu.krylova@mail.ru

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является перспективным и активно развивающимся методом лечения онкологических заболеваний. Терапевтический эффект основан на применении фотосенсибилизаторов (ФС), которые под действием света определенной длины волны и в присутствии кислорода запускают фотодинамические реакции в клетке, приводящие к ее гибели. Однако существует ограничение в применении данного метода, связанное с низкой селективностью накопления ФС в опухолевой ткани. Одним из вариантов решения данной проблемы является разработка конъюгатов ФС с различными биологически активными молекулами (антитела, полисахариды, пептиды, факторы роста и т.д.) или использование наноносителей (наночастицы, липосомы, полимеры). Наибольший интерес представляют конъюгаты ФС с углеводами, которые взаимодействуют с углевод-специфическими рецепторами опухолевой клетки.

Целью настоящей работы явилось исследование фотофизических и биологических свойств двух потенциальных агентов для ФДТ, представляющих собой конъюгаты цинкового комплекса хлорина *е6* с моносахаридами (галактозой и глюкозой).

В ходе исследования фотофизических свойств были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции, определен квантовый выход флуоресценции исследуемых конъюгатов. Исследование биологических свойств *in vitro* проводили на культурах клеток эпидермоидной карциномы человека А-431. Было проанализировано внутриклеточное накопление соединений методом конфокальной микроскопии. Определена их цитотоксическая активность методом МТТ-теста. Для анализа фотодинамической активности культуру клеток облучали в дозе 20 Дж/см² на длине волны 670 нм.

Исследованные в работе соединения обладают интенсивным поглощением и флуоресценцией в красной области спектра. Квантовый выход флуоресценции не превышает 6%. Установлено, что исследуемые соединения накапливаются в клетках в течение 4 часов и способны вызывать фотоиндуцированную гибель клеток. Темновая токсичность конъюгатов наблюдалась при концентрациях 20-25 мкМ. При облучении в дозе 20 Дж/см² токсичность существенно возрастала, концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) не превышала 0,5 мкМ.

Полученные данные свидетельствуют об эффективности исследуемых соединений и позволяют рассматривать их в качестве потенциальных агентов для ФДТ.

Работа осуществлена в Научно-исследовательской лаборатории химии природных соединений и их синтетических аналогов созданной в рамках Государственного задания при НОЦ «Техноплатформа «Техноплатформа 2035» (FSWR-2021-014) и при финансовой поддержке Проекта Министерства науки и высшего образования РФ (0729-2020-0061).



ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ СОМАТИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Кучур П.Д., Комиссаров А.С.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский институт ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

chesnokova@scamt-itmo.ru

Эволюция бактерий направлена на переход от свободноживущих к ассоциированным с хозяевами формам. Первой структурой, на которую отвечает иммунитет хозяина, является О-антиген. Эта дистальная часть липополисахаридов, локализованных на поверхности бактерий, подвержена эволюционному отбору. Благодаря ее высокой изменчивости бактерия может успешно “прятаться” от иммунных клеток хозяина. Вклад в изменчивость О-антигена также могут вносить бактериофаги, приводя к появлению IS элементов и транспозонов в геноме бактерий.

Существует ряд исследований, рассматривающих состав О-антигенов на генном уровне, но этот уровень не дает представления о соматическом антигене как о целостной структуре. В предыдущем исследовании мы убедились, что О-антиген обычно представлен группой оперонов, локализованных в разных частях генома бактерий. Мы задались вопросом, какие отличительные черты присущи О-антигенам патогенных бактерий, если изучать их на уровне оперонов.

Исходными данными являются геномы двух родов бактерий – *Herbaspirillum sp.* и *Providencia sp.* Выбор основан на разнообразии образов жизни этих бактерий: свободноживущие, мутуалисты, оппортунистические виды и облигатные патогены. Поиск оперонов О-антигена основан на проверке качества исходных геномов, их аннотации, выделении границ оперонов, идентификации оперонов О-антигена и их визуализации.

Объектами нашего исследования являются 5 видов рода *Providencia sp.*, включающего условно-патогенные и патогенные штаммы и 11 видов *Herbaspirillum sp.*, представляющего все образы жизни. Из базы данных NCBI были отобраны 28 полных геномных сборок *Providencia sp.* и 53 сборки *Herbaspirillum sp.*

О-антигены 6 представителей *Providencia sp.* несут IS-элементы, приводящие к поломкам генов: *P. rettgeri* – 2 штамма, *P. stuartii* – 1, *P. rustigianii* – 2, *P. heimbachae* – 1. У *P. rettgeri*, выделенной из образцов пациента с урогенитальной инфекцией, обнаружена вставка транспозона, несущего гены устойчивости к тетрациклину *tetD*, *tetA*, *tetC* и *tetR*.

Обнаружение инвертированного оперона из четырех генов стало ключевой особенностью соматических антигенов оппортунистических и патогенных гербаспирилл. У патогенных штаммов *Herbaspirillum* инвертированный оперон ограничен оперонами с генами *gmhA* и *rfbB*. Бактерии-мутуалисты не имеют подобного оперона.

Таким образом, состав О-антигенов тесно коррелирует с образом жизни бактерий. Особенно четко такая зависимость наблюдается у патогенных микроорганизмов.



ПОСТРОЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ СЕТЕЙ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ НАЙДЕННЫХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ И ИХ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ

Лахова Т.Н.¹, Мухин А.М.¹, Ощепков Д.Ю.¹, Лашин С.А.^{1,2}

¹Курчатовский геномный центр Института Цитологии и Генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия;

²ФГБОУ ВПО Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

tlakhova@bionet.nsc.ru

Регуляция транскрипции играет важную роль для жизнедеятельности бактерий. За последние годы накоплен огромный объём данных полногеномного секвенирования. Потенциал этих данных с точки зрения анализа регуляции экспрессии генов раскрыт далеко не полностью. Более того, с каждым годом количество данных, имеющих значение для изучения экспрессии, увеличивается. Немаловажным является тот факт, что с помощью различных экспериментальных методик появляются новые знания о регуляторных взаимодействиях, но всё же остается малоизученным вопрос о регуляторных сетях в бактериях. Например, для модельного организма *Escherichia coli* до сих пор не полностью решена задача о полном описании генетической регуляции. Для других бактерий доступно ещё меньше информации. Поэтому изучение и построения регуляторных сетей для бактерий является актуальной задачей.

В рамках работы мы анализировали аннотированные геномы бактерий из базы данных Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН. Анализируемые геномы дополнительно размечались транскрипционными факторами (ТФ) и их сайтами связывания (ССТФ), поскольку первичная автоматическая аннотация не даёт такой информации. Для этой цели был разработан вычислительный конвейер, который состоит из следующих этапов: определение оперонной структуры генома (сервис Operon-mapper), выявление промоторных областей с помощью разработанных скриптов на Python, определение мотивов *de-novo* (пакет программ VoBro 2.0) и сравнение полученных мотивов с ССТФ известных ТФ из баз данных CollecTF и Prodigic (программа TomTom). Данный конвейер позволяет автоматически генерировать предсказанные данные по последовательности генома бактерии и координат расположения генов.

Дополнительную информацию о ТФ мы получали из реализованного алгоритма, который заключался в экстракции данных о ТФ из базы Uniprot (собственный скрипт на Python), выравнивания последовательностей ТФ на аннотированные геномы (Blast+), отбор и фильтрация данных (также собственный скрипт на Python).

Также разработали алгоритм для построения ТРС реализован на языке Python с использованием полученных данных о ТФ и ССТФ. Для визуализации, полученных сетей, мы использовали Cytoscape. Функциональность программы позволяет выбрать построение сети с использованием структуры оперонов или без неё. Выбор структуры может быть полезен при дальнейшем анализе сетей.

Работа выполнена за счет финансирования Курчатовского геномного центра ИЦиГ СО РАН (075-15-2019-1662).



СТРУКТУРНЫЙ БАЗИС СЕЛЕКТИВНОСТИ И ОБРАТНОГО АГОНИЗМА В РЕЦЕПТОРАХ S1P5

**Ляпина Е.А.¹, Марьин Е.В.^{1,2}, Гусач А.Ю.¹, Орехов Ф.С.^{1,3}, Герасимов А.С.⁴,
Лугинина А.П.¹, Вахрамеев Д.Д.¹, Эргашева М.М.¹, Хусаинов Г.А.¹, Попов П.^{1,5},
Борщевский В.И.^{1,6}, Мишин А.В.¹, Черезов В.Г.^{1,7}**

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

²University of Groningen, Groningen, The Netherlands;

³ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;

⁴ФГБОУ ВО Вятский государственный университет;

⁵АНОО ВО Сколковский институт науки и технологий;

⁶Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany;

⁷University of Southern California, Los Angeles, USA

elizaveta0503@gmail.com

Биологически активной лизофосфолипид сфингозин-1-фосфат (S1P) действует через пять разных подтипов рецепторов, сопряжённых с G-белком: S1P₁₋₅. Рецептор S1P₅ экспрессируется в основном в нервной и иммунной системах, регулируя выход естественных киллеров из лимфатических узлов, и играя роль в иммунных и нейродегенеративных заболеваниях, а также в канцерогенезе. Существует несколько терапевтических лекарств, облегчающих течение этих заболеваний, однако они не селективны в отношении подтипов рецепторов, что вызывает побочные эффекты. Полезным инструментом рационального дизайна лекарственных средств является пространственная структура белка, которая представлена в этой работе.

В этой работе мы описываем кристаллическую структуру рецептора S1P₅ в комплексе с обратным агонистом разрешением в 2,2 Å, полученную с помощью серийной фемтосекундной кристаллографии на лазере на свободных электронах в лаборатории ускорителей Пхохан (PAL-XFEL) и анализируем связь структуры с активностью. Эта структура демонстрирует уникальный способ связывания с лигандом, который включает в себя аллостерический подкарман связывания, определяющий специфичность к подтипам и предоставляющий шаблон для рационального дизайна лекарственных средств. В сочетании с ранее опубликованными структурами рецепторов S1P новая структура с обратным агонистом проливает свет на механизм активации и открывает структурные детерминанты обратного агонизма в семействе S1P-рецепторов.

Работа выполнена при поддержке Министерство науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА FSEC ПРИ СКРИНИНГЕ КОНСТРУКЦИЙ GPCR ДЛЯ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

Маркеева Е.А., Хорн П.А., Василенко Л.М., Мишин А.В.

ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

markeeva.ea@phystech.edu

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), представляют собой суперсемейство семиспиральных трансмембранных белков. Получение их пространственной структуры крайне важно для разработки лекарств и перехода к персонализированной медицине. Одним из основных методов получения структуры GPCR является рентгеноструктурный анализ, который требует получения кристаллов белка. Однако экспрессия и кристаллизация GPCR сопряжены с рядом трудностей. Для их преодоления необходимо введение в последовательность GPCR точечных мутаций, фьюжн-партнеров, а также удаление участков белковой последовательности, после чего проводят скрининг полученных конструкций, измеряя поверхностную экспрессию, термостабильность и анализируя профиль гель-фильтрации (SEC). Для проведения стандартных тестов необходимо выделить и очистить белок, что является трудоемким процессом. Для его оптимизации возможно использование метода анализа профиля гель-фильтрации с детекцией флуоресценции (FSEC). Его суть заключается во введении на этапе клонирования в последовательность целевого рецептора на N- или C-конец последовательности, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP). Это позволяет, не проводя хроматографическую очистку после выделения рецептора из мембраны, проверить его термостабильность и профиль SEC. Таким образом, отбор наиболее перспективных для кристаллизации кандидатов становится более быстрым и менее трудоемким. Главным требованием при этом является минимизация влияния флуоресцентного белка на фолдинг исследуемого рецептора.

Цель этой работы – на примере модельного GPCR показать применимость метода FSEC для более быстрого и простого, в сравнении со стандартным методом, отбора кандидатов для кристаллизации. Для выполнения работы требуется: из множества вариантов GFP выбрать наиболее подходящий для дальнейшего введения в GPCR, ввести последовательность GFP на N- или C-конец рецептора, провести бакуловирусную экспрессию модифицированного GFP рецептора и рецептора без модификации, оценить поверхностную экспрессию обеих конструкций с помощью проточной цитометрии, выделить и очистить полученные конструкции, проанализировать профили плавления и гель-фильтрации исследуемых препаратов. На основании проделанной работы будет сделан вывод о возможности использования метода FSEC для отбора конструкций GPCR для проведения кристаллизации.

Работа выполнена при поддержке Министерство науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-00337-20-03, проект FSMG-2020-0003).



КОМПЬЮТЕРНОЕ ПРЕДСКАЗАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА HSPB8

Мартынов Д.Д., Козлова А.С., Акберова Н.И.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Казань, Россия

DDMartynov@stud.kpfu.ru

Малый белок теплового шока 8 (HspB8) относится к семейству малых белков теплового шока и играет важную роль в ответной реакции организма на различные стрессы, митотическом делении клеток и клеточной аутофагии. Так, HspB8 совместно с белком BAG3 (Bcl-2-ассоциированный антагонист 3) участвует в активации процесса селективной аутофагии с помощью шаперонов, способствуя приобретению клеточной устойчивости к ингибиторам протеасом. Пространственная структура HspB8 в настоящее время не определена, и целью работы было предсказание компьютерной модели структуры HspB8.

Для поиска консервативных доменов и предсказания структуры белка была взята последовательность из базы данных Uiprot id Q9UJY1.1. Поиск консервативных доменов в HspB8 проводился при помощи множественного выравнивания методом MAFFT. Предсказание трехмерной структуры провели методом тридинга (I-Tasser) и *ab initio* (QUARK и Robetta). Сравнительный анализ качества полученных моделей и выбор наиболее вероятной структуры проводился с использованием метода сходимости (рассчитанной на основе RMSD предсказанных моделей) и параметров оценки стабильности: количества аминокислот в запрещенных зонах на карте Рамачандрана и QMEAN оценки. Полученную структуру стабилизировали методом равновесной молекулярной динамики. Молекулярная динамика проводилась в программе NAMD с использованием силового поля CHARMM36, в явном растворителе, ионы NaCl добавляли в концентрации 0,15M. Общее время симуляции составило 300 нс.

Обнаружены две наиболее консервативные области в районах 28-36а.о. и 95-170а.о. аминокислотных остатков. Первая область соответствует общему мотиву для всего семейства малых белков теплового шока, описанному в литературе, и представлена короткой альфа-спиралью. Вторая область – общий для семейства альфа-кристаллиновый домен, представленный на нашей модели как бета-складчатая структура. Расчет гидрофобных взаимодействий показал наличие в нашей модели гидрофобных взаимодействий у 107P и 158L; 110L и 158L; 112V и 154V; 112V и 156A, что соответствует предсказанной экспериментально гидрофобной впадинке между beta 4 и beta 8 складкой альфа-кристаллинового домена, участвующей во взаимодействии с BAG3.



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФАЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ПРИ ДЕЙСТВИИ КОРПУСКУЛЯРНОГО ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОЙ И НИЗКОЙ МОЩНОСТИ ДОЗЫ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Молодцова Д.С., Сороко С.С., Шилягина Н.Ю.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

89087532503dasa@gmail.com

Большинство работ радиобиологического профиля посвящено исследованию механизмов действия фотонного излучения в режиме острого воздействия. Информация о механизмах действия корпускулярного излучения отрывочна и зачастую противоречива. В связи с этим остро стоит вопрос о необходимости более глубокого понимания механизмов ответа клетки на действие ионизирующего излучения (ИИ) корпускулярной природы в различных режимах и дозах воздействия.

Целью данной работы явился сравнительный анализ изменений клеточного цикла при действии корпускулярного ИИ высокой и низкой мощности дозы в отношении опухолевых клеток в культуре.

Для моделирования режима облучения высокой мощности дозы использовали линейный ускоритель Novalis Tx с энергией электронов 6 МэВ и мощностью дозы 10 Гр/мин. При моделировании режима облучения низкой мощности дозы использовали бета-эмиссионные закрытые препараты Sr-⁹⁰Y, активностью 3 МБк и мощностью дозы 1,5 Гр/ч.

Исследования клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S с использованием протоколов производителей коммерческих наборов Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit.

Нами было показано, что ответ опухолевых клеток на радиационное воздействие проявляется в изменении соотношения фаз клеточного цикла: через 24 часа после облучения в режиме высокой мощности дозы зарегистрировано увеличение количества клеток, находящихся в фазе G2/M. В режиме низкой мощности дозы подобной закономерности выявлено не было. Через 72 часа после воздействия в режиме высокой мощности было зарегистрировано дозозависимое увеличение числа мёртвых клеток, погибших в процессе одного из первых четырёх пострадиационных митозов и увеличение количества «гигантских клеток». Через 24 и 48 часов после воздействия количество мёртвых клеток было заметно ниже.

Мы полагаем, что полученные нами результаты позволят приблизиться к более глубокому пониманию механизмов ответа клетки на действие корпускулярного ИИ, с целью последующей разработки стратегии модификации радиочувствительности клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание № 0729-2020-0061).



СЕРТОНИН В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ
DICROCOELIUM LANCEATUM (TREMATODA, PLATYHELMINTHES)

Мочалова Н.В.¹, Крещенко Н.Д.², Теренина Н.Б.¹

¹ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, Россия;

²ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пушчино, Россия

chiljuta@mail.ru

В нервной системе паразитических плоских червей выявлен ряд нейрональных сигнальных веществ, в том числе широко распространённый в животном мире нейромедиатор серотонин. Предполагается важная роль серотонина в регуляции различных функций паразита, включая мышечную активность.

Задачей нашей работы явилось исследование наличия и локализации серотонина в нервной системе трематоды *Dicrocoelium lanceatum*, возбудителя широко распространённого паразитарного заболевания жвачных животных – дикроцелиоза, вызывающего большие экономические потери. С помощью иммуноцитохимического метода и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии серотонин был выявлен в центральных и периферических отделах нервной системы *D. lanceatum*.

Серотонин-иммунопозитивные (5-НТ-ип) нейроны и нейриты обнаружены в парных головных ганглиях, в мозговой комиссуре, в трёх парах продольных нервных стволах – вентральных, дорзальных и латеральных, а также в нейронах, расположенных по ходу вентральных нервных стволов. Ротовая присоска обильно иннервируется 5-НТ-ип нейритами, идущими от головных ганглиев, дорзальных нервных стволов, а также нейронов, расположенных вблизи ротовой присоски. Вентральная присоска иннервируется 5-НТ-ип нейритами, идущими от нервных клеток, расположенных в вентральных нервных стволах. Элементы серотонинергической системы выявлены в дистальной части репродуктивной системы (матке, мешке цирруса, циррусе, области репродуктивной поры). Полученные данные предполагают важную роль серотонинергической нервной системы в функционировании прикрепительных органов и репродуктивной системы паразита.

Результаты по организации нервной системы *D. lanceatum* расширяют наши представления о структуре и возможной функции серотониновой нервной системы паразитических плоских червей. Кроме того, полученные данные дают основание предположить, что серотониновая нервная система паразита может служить потенциальной мишенью при разработке новых антипаразитарных препаратов.



ДИЗАЙН ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА НА ОСНОВЕ LOV-ДОМЕНА СО СМЕЩЕННЫМ СПЕКТРОМ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

**Назаренко В.В.¹, Ремеева А.А.¹, Богородский А.О.¹, Ковалев К.В.^{1,2},
Борщевский В.И.^{1,3,4}, Гуцин И.Ю.¹**

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

²European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Germany;

³IBI-7: Structural Biochemistry, Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, Germany;

⁴JuStruct: Jülich Center for Structural Biology, Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany

veranaz94@gmail.com

Флаavin-связывающие флуоресцентные белки (FbFP), основывающиеся на про- и эукариотических фоторецепторах света, кислорода, напряжения (LOV), являются многообещающими генетически кодируемыми репортерными белками. Малый размер (≈ 12 кДа) и присутствие флавинов в большинстве типов живых клеток являются ключевыми преимуществами этих белков для мониторинга транспорта и анаэробных биологических процессов по сравнению с GFP-подобными белками [1].

Недавно, на основе гена из термофильной фототрофной бактерии *Chloroflexus aggregans*, нами был разработан термостабильный флуоресцентный белок CagFbFP, и получена его кристаллографическая структура [2]. Несмотря на то, что белок имел температуру плавления около 68 °C, при помощи мутаций его удалось дополнительно стабилизировать на 2 °C [3]. Так как получение многоцветных изображений, разработка FRET-биосенсоров на основе FbFP и создание оптогенетических инструментов на основе LOV требуют разработки FbFP со смещенными спектрами, мы также создали панель вариантов CagFbFP путем мутации ключевой аминокислоты глутамина (Gln148) на заряженные аминокислоты [4]; к сожалению, среди данного ряда вариантов спектры флуоресценции были сдвинуты только в синюю область. Введение мутаций Q148K и I52T в CagFbFP, по аналогии с мутациями V392T–Q489K белка iLOV [6], привело к созданию варианта со спектром, смещенным в красную область. Вместе, полученные варианты показали значительно отличающиеся спектры (смещение максимумов флуоресценции на 6 нм в синюю и на 7 нм в красную область, соответственно). Было показано, что идентифицированные мутанты позволяют проводить двухцветную микроскопию с одной длиной волны возбуждения и наблюдением в одном спектральном диапазоне [6]. Таким образом, белок CagFbFP и его варианты являются многообещающими моделями для структурных исследований LOV-доменов и для применения в качестве флуоресцентных репортеров.

Литература.

1. Drepper T. et al. Nat. Biotechnol. 2007.
2. Nazarenko V. et al. Photochem. Photobiol. Sci. 2019.
3. Remeeva et al. Crystals 2020.
4. Remeeva et al. Proteins 2021.
5. Davari M.D. et al. J. Phys. Chem. B. 2016.
6. Röllen K. et al. J. Biol. Chem. 2021.



АНАЛИЗ КИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛИГАНДОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ

Мухаметгалиева А.Р., Фаттахова А.Н., Массон П.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

aliya_rafikovna@mail.ru

Семейство холинэстераз в организмах представлено двумя ферментами ацетилхолинэстеразой, АХЭ (3.1.1.7) и бутирилхолинэстеразой, БХЭ (3.1.1.8). Оба фермента имеют схожее строение активного сайта и до 65% гомологичных аминокислотных остатков. Несмотря на общее строение и похожие механизмы связывания лигандов, АХЭ и БХЭ имеют различия в строении некоторых из них, и также выявляются некоторые отличия в механизмах гидролиза.

Лиганды холинэстераз в зависимости от заряда могут по-разному влиять на кинетическое поведение АХЭ и БХЭ. Аллостерическое взаимодействие положительно заряженных субстратов холинэстераз при избытке меняют значение константы k_{cat} на $k_{cat} \cdot b$, тем самым активируя фермент, в случае с БХЭ, или, ингибируя фермент, в случае с АХЭ. Разное поведение двух холинэстераз имеет фармакологический интерес при поиске лекарственных средств для терапии нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, выявление механизмов нежелательных конкурирующих взаимодействий с природным положительно заряженным субстратом – ацетилхолином является актуальной задачей.

В работе были изучены кинетические особенности холинэстераз методом конкурирующих субстратов полного и неполного гидролиза, рассмотрено сродство лигандов к участкам активного сайта методом молекулярного докинга [1]. С помощью метода конкурирующих субстратов полного гидролиза [2] были определены каталитические параметры, и выявлены эффекты активации/ингибирования девяти субстратов и трех ингибиторов [3]. С помощью метода конкурирующих субстратов неполного гидролиза были изучены механизмы ингибирования холинэстераз высокими концентрациями положительно заряженных субстратов [4]. Полученные результаты *in vitro* согласуются с полученными данными *in silico*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФ № 20-14-00155 и РФФИ № 19-34-90120.

Литература.

1. Мухаметгалиева А.Р., Козлова А.С., Акберова Н.И., Фаттахова А.Н. // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. 2021. № 1 (163). С. 5–19. doi: 10.26907/2542-064X.2021.1.5-19
2. Goličnik M., Masson P. // *Chemico-Biological Interactions*. 2019. V. 309. 108704. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.017
3. Mukhametgaliyeva A. R., Aglyamova A.R., Lushchekina S.V., Masson P. // *Chemico-Biological Interactions*. 2019. V. 310. 108702. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.015
4. Mukhametgaliyeva A. R., Lushchekina S.V., Aglyamova A.R., Masson P. // *Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*. 2022. № 1 V. 1870. 140733. doi:10.1016/j.bbapap.2021.140733



ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ПРОРОСТКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*,
ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО
НИЗКОДОЗОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Подлутский М.С., Подобед М.Ю., Бабина Д.Д., Блинова Я.А., Волкова П.Ю.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии,
Обнинск, Россия

mikhail.podlutskii@gmail.com

В эксперименте использовали семена *Arabidopsis thaliana*, отобранные на территории Полесского государственного радиозоологического заповедника (Республика Беларусь) в районе расположения трех бывших населенных пунктов (Бабчин, Масаны и Выгребная Слобода), подвергшихся радиоактивному загрязнению в результате аварии, произошедшей на Чернобыльской АЭС.

Для получения проростков *A. thaliana*, отобранные семена стратифицировали в течение 7-х дней, высаживали в чашки Петри на полусильную питательную среду Мурасиге-Скуга (с добавлением 0.3 % сахарозы) и помещали в фитотрон MLR-351H (Япония), где выращивали в течение 13-ти дней в режиме длинного светового дня.

Из полученных 13-дневных проростков *A. thaliana* выделяли тотальную РНК с использованием специализированного набора GeneJet Plant RNA Purification Mini Kit (США). Полученные образцы РНК передавали в компанию ЗАО «Евроген» (Российская Федерация) для выполнения секвенирования парных прочтений на приборе Illumina NovaSeq 6000 SP (США). В результате секвенирования было получено 526 890 512 прочтений.

Качество полученных данных оценивали при помощи FastQC v.0.11.9 и MultiQC v.1.10. Прочтения низкого качества фильтровали с помощью Trimmomatic v.0.40 в режиме парных прочтений (Paired End Mode). HISAT2 v.2.1 использовали для сопоставления и картирования полученных прочтений на эталонный геном *A. thaliana* (TAIR10) с дополнительным выравниванием (-downstream-transcriptome-assembly), необходимым для правильной работы сборщика транскриптов StringTie v.2.1.1. Анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) выполняли с использованием программного пакета edgeR v.3.14.

При изучении общего ответа на хроническое облучение проростков *A. thaliana*, полученных из семян, отобранных с двух загрязненных участков (Масаны и Выгребная Слобода) по сравнению с контрольной популяцией (Бабчин), было выявлено 105 общих ДЭГ (80 генов с повышенной экспрессией и 25 генов с пониженной экспрессией). Анализ функционального обогащения позволил выявить ряд основных терминов, характеризующих защитный ответ (*AT1G63860*, *AT1G63870*, *AT3G21080*, *AT4G36140*, *AT5G03355*, *AT2G44370*, *LECRKA4.2* и *AT5G49780*), окислительно-восстановительные процессы в клетках (*CYTC6A*, *CYP705A27*, *CYP709B2*, *AT2G46455*, *CYP705A13*, *CYP71A23*), фитогормональный ответ (*UGT76E3*, *ARR15*, *AT2G44380*, *AT3G47580*) и передачу стрессового сигнала (*AtRLP19*, *AT5G42460*, *AT3G18320*, *AT1G25211*, *AT1G24881*, *AT1G25055*, *AT4G04402*, *AT1G25150*, *AT5G56370*, *AT3G52680*, *AT5G38590*, *AT1G35710*, *AT1G27540*).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 20-74-10004.



ПРИМЕНЕНИЕ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ АНАЛИЗА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ОТВЕТА ИНДИВИДУАЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ НА СТРЕСС

Попков В.А.¹, Макиевская К.И.^{2,1}, Андрианова Н.В.¹, Плотников Е.Ю.¹

¹НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

makievskaya.ciara@gmail.com

Современные биомедицинские исследования указывают на высокий уровень гетерогенности реакции клеток и отдельных органелл на разные воздействия. Существуют заболевания, фенотипическое проявление которых зависит не от самого наличия патологического фактора, а от соотношения субпопуляций клеток / органелл, несущих и не несущих данный признак (например, мутацию в мтДНК). Подобная логика применима ко многим патологиям. Например, ишемические патологии (такие как инсульт) во многом определяются следующим лавинообразным процессом:

- 1) единичные слабо устойчивые к повреждению митохондрии в единичных клетках повреждаются;
- 2) их повреждение ведет к повреждению соседних митохондрий в этих клетках;
- 3) эти клетки погибают, высвобождая в ткань повреждающие факторы;
- 4) повреждаются соседние клетки;
- 5) повреждается весь орган.

Данный процесс можно остановить на самом первом шаге. Подобные работы являются горячей темой мировой науки. Однако многие исследователи сталкиваются со сложностями при популяционном анализе. Наиболее информативна для анализа конфокальная микроскопия, однако существующими инструментами для анализа индивидуальных митохондрий в клеточной культуре даже в очень простом эксперименте необходимо вручную проанализировать параметры свыше нескольких десятков тысяч митохондрий, что займет сотни часов работы. При усложнении эксперимента трудоемкость анализа растет экспоненциально.

Уже давно существует широкий спектр автоматизированных подходов к анализу изображений, включающий как очень простые алгоритмы, так и алгоритмы машинного и глубокого обучения. По общемировому опыту, простые подходы плохо работают для изучения тонких механизмов внутриклеточных процессов. Поэтому сейчас в мире активно разрабатываются подходы, связанные с машинным обучением, однако все они требуют тонкой сонастройки машинного обучения и дизайна эксперимента.

Таким образом, целью нашей работы послужила разработка клеточных тест систем, адаптированных для потокового анализа механизмов воздействия веществ на толерантность индивидуальных митохондрий клеток в популяции к повреждающему воздействию с применением конфокальной микроскопии и машинного обучения. Наши промежуточные результаты заключаются в подборе протоколов съемки клеток, а также написании программ для анализа изображений с использованием машинного обучения, адаптированных под эти модели. В будущем наш подход позволит производить скрининг веществ, обладающих интересующими эффектами на индивидуальные митохондрии.

Данное исследование поддержано Российским научным фондом (грант # 21-75-30009).



ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ХЛОРОФИЛЛА КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ РАДИОПРОТЕКТОРЫ

Ромодин Л.А.

ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва, Россия

rla2904@mail.ru

Разработка эффективных, и при том нетоксичных, радиозащитных препаратов – одна из главных задач радиобиологии. С конца прошлого века различными научными коллективами проводятся исследования радиопротекторных свойств препаратов на основе хлорофилла [1].

А.В. Поздеев, выполняя под руководством профессора Н.П. Лысенко докторскую диссертацию [2], провёл обширные исследования радиозащитного действия препарата хлорофилла на мышах. Значение фактора изменения дозы (ФИД) γ -излучения для этого препарата находилось в диапазоне 2–4 для различных доз излучения. ФИД – это отношение дозы излучения, вызывающей гибель половины получивших препарат животных, к дозе, смертельной для половины особей, не получивших его.

В большинстве работ применяли не сам хлорофилл, нерастворимый в воде, а водорастворимый продукт его омыления – хлорофиллин [1]. Хлорофиллин и сам хлорофилл обладают антиоксидантным действием [2,3], которое, по-видимому, и обеспечивает радиозащитный эффект. На молекулярной модели методом регистрации усиленной кумарином-334 хемилюминесценции было показано, что хлорофиллин ингибирует перекисное окисление липидов (ПОЛ), при этом половинное угнетение ПОЛ вызывал хлорофиллин в концентрации 3,7 мкМ; это позволяет сделать вывод о торможении им метаболизма липидных радиотоксинов [4].

Очевидна актуальность разработки радиозащитных препаратов на основе хлорофилла. Необходимо разработать наиболее эффективную клинически приемлемую форму препарата. Наиболее многообещающим нам кажется применение водорастворимого хлорофиллина в составе липосом, на поверхности которых имеются лиганды к специфическим рецепторам радиочувствительных клеток.

Литература.

1. Ромодин Л.А., Лысенко Н.П. Радиопротекторное действие препаратов на основе хлорофилла // Биофизика. 2022. № 67(1) – С.: 96–104.
2. Поздеев А.В. Разработка радиозащитных средств на основе веществ растительного и минерального происхождения. Диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук. 2015 – 313 с.
3. Kumar S.S., Shankar B., Sainis K.B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes *in vitro* and *in vivo* // Biochimica et biophysica acta. 2004. № 1672(2) – P.: 100–111.
4. Ромодин Л.А. Угнетение хлорофиллином хемилюминесценции, сопровождающей катализируемую комплексом цитохрома *c* с кардиолипином квазилипоксигеназную реакцию // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2020. № 20(4) – С.: 427–432.



ИЗМЕНЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ДЕЙСТВИЮ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ДЕПРИВАЦИИ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ПРИ ПЕРЕХОДЕ ОТ 2D- К 3D-КУЛЬТИВИРОВАНИЮ

Сенча Л.М., Добрынина О.Е., Поспелов А.Д., Балалаева И.В.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет имени Н. И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

luda-sencha@mail.ru

Взаимодействие опухолевых клеток с матриксом может приводить к модуляции большого количества внутриклеточных сигнальных путей. Эти изменения могут приводить к формированию фенотипа клеток, обеспечивающего существование и пролиферацию клеток в особых условиях опухолевого микроокружения, а также резистентности клеток к воздействию цитотоксических соединений. Целью данной работы являлся сравнительный анализ устойчивости опухолевых клеток к дефициту питательных веществ и гипоксии, а также к действию терапевтических агентов при культивировании клеток в монослое и коллагеновом гидрогеле.

В работе были использованы клетки карциномы яичника человека SKOVip-kat и клетки эпидермоидной карциномы человека A431-GFP, обе линии клеток экспрессируют флуоресцентные белки. Было проанализировано влияние на рост 2D и 3D-культур питательной депривации (культуральная среда без FBS/глюкозы) и гипоксии (1% O₂). Определение жизнеспособности клеток в монослойной культуре осуществляли с помощью МТТ-теста. В случае коллагеновых гидрогелей использовали подход, основанный на регистрации интегральной флуоресценции гелей без их разрушения. Было также проведено сравнительное исследование устойчивости опухолевых клеток, культивируемых в монослое и коллагеновом гидрогеле, к действию цисплатина и противоопухолевого таргетного токсина DARPIn-LoPE.

Полученные результаты показали, что клетки A-431-GFP в составе гидрогеля обладают большей устойчивостью к действию сывороточной и глюкозной депривации по сравнению с клетками данной линии в монослое. Для линии SKOVip-kat, наоборот, характерно понижение устойчивости клеток к сывороточной депривации при переходе от 2D к 3D культивированию, в то время как к воздействию глюкозной депривации данные клетки демонстрируют относительную нечувствительность. Анализ действия гипоксии на клетки, выращиваемые в гидрогелях, показал, что A-431-GFP замедляют пролиферацию, в то время как рост клеток SKOVip-kat статистически значимо от контроля не отличается. Культивирование клеток в гидрогеле также привело к повышению устойчивости опухолевых клеток к цисплатину и белковому токсину.

Таким образом, показано, что резистентность опухолевых клеток к депривации и действию противоопухолевых агентов может существенно изменяться в зависимости от условий культивирования, что может быть обусловлено морфофункциональными особенностями клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-20168).



ОТВЕТ КЛЕТОК ЭПИДЕРМОИДНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА A431 НА ОБЛУЧЕНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ БЕТА-ИЗЛУЧЕНИЕМ И ПОТОКОМ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ЭЛЕКТРОНОВ

**Сороко С.С., Молодцова Д.С., Балалаева И.В., Брилкина А.А.,
Воденев В.А., Шилягина Н.Ю.**

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

kastarashan@gmail.com

Радионуклидные методы терапии набирают всё большую популярность в лечении онкологических заболеваний. Однако механизм действия корпускулярного ионизирующего излучения в контексте сравнения низкоинтенсивного и высокоинтенсивного излучения на опухолевые клетки изучен недостаточно.

Целью исследования – сравнительная оценка ответа клеток эпидермоидной карциномы человека A431 на воздействие в режиме низко- и высокоинтенсивного корпускулярного ионизирующего излучения.

Для моделирования высокоинтенсивного режима облучения использовали линейный ускоритель Novalis Tx. Дозу контролировали временем облучения. При моделировании низкоинтенсивного режима облучения использовали бета-эмиссионные закрытые препараты Sr-Y-90. Дозу контролировали временем и мощностью источника. Оценку жизнеспособности клеток проводили через 24 и 72 часа после облучения методом МТТ-теста.

Мониторинг продукции активных форм кислорода в клетках осуществляли с помощью дихлордигидрофлуоресцеина диацетата H₂DCF-DA, исследование проводили методом конфокальной лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии.

Оценку соотношения фаз клеточного цикла и анализ механизмов клеточной гибели через различные временные точки и дозы воздействия проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре CytoFLEX S. Пробоподготовку проводили согласно протоколу производителя коммерческого набора.

Показано, что процент жизнеспособных клеток при оценке через 72 часа после облучения в несколько раз ниже, чем через 24 часа. При сравнении полуметальных доз LD₅₀ в двух разных режимах зарегистрированы более низкие значения LD₅₀ при высокоинтенсивном режиме воздействия электронов высоких энергий, по сравнению с действием низкоинтенсивного бета-излучения.

Зарегистрировано увеличение количества клеток, претерпевающих арест или радиационный блок митозов в фазе G₂/M после высокоинтенсивного облучения. В случае низкоинтенсивного бета-излучения подобной закономерности выявлено не было. В свою очередь ответ клеток A431 на высокоинтенсивное радиационное воздействие проявляется и в увеличении концентрации внутриклеточного пероксида водорода в клетках в 4 раза по сравнению с контролем. Через 72 часа после воздействия электронов высоких энергий зарегистрировано дозозависимое увеличение числа мёртвых клеток. Через 24 и 48 часов после воздействия количество мёртвых клеток было заметно ниже, что может быть связано с тем, что клеточная гибель наступает в процессе одного из первых четырёх пострадиационных митозов.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА РОСТ СУБСТРАТЗАВИСИМЫХ КЛЕТОК

Степанова Т.А., Белова Н.А.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

TTA-pro@yandex.ru

Сегодня тканевая инженерия решает проблемы эффективной регенерации различных тканей. Аутотрансплантаты являются «золотым стандартом», но результативны лишь в 50% случаев. Альтернативой являются искусственные трансплантаты из таких синтетических материалов, как полилактид, биоактивное стекло и гидроксипатит. Перспективными для этого представляются также пьезоэлектрические материалы, способные к электростимуляции клеток, что вызывает ускоренную регенерацию тканей. Также ранее было показано, что с помощью постоянного магнитного поля можно не только стимулировать генерацию напряжения у пьезоматериалов, но и воздействовать на пролиферацию и дифференцировку остеобластов.

Целью нашей работы является определение возможности использования постоянного магнитного поля (ПМП) для воздействия на рост субстратзависимых клеток.

Результаты первой серии экспериментов по оценке условий культивирования клеток остеосаркомы человека линии MNNG-HOS показали, что кратковременное (2 часа) воздействие может проводиться без поддержания 5% CO₂ и не приводит к значимому изменению динамики роста клеток, в сравнении с контрольной группой, которая культивировалась в стандартных условиях CO₂-инкубатора. При этом среда ДМЕМ+F-12 с NERES была определена как оптимальная для роста клеток в данных условиях.

Для проведения дальнейших экспериментов использовали различные ПМП. Клетки находились либо в поле неодимового магнита с индукцией 250 мТл, либо между двумя, закреплёнными на расстоянии 5.8 см, неодимовыми магнитами с индукцией поля 250 мТл каждый. В обоих случаях опыты проходили в термостатируемой камере или термостате.

Двухчасовая инкубация клеток линии MNNG-HOS под воздействием ПМП не показала значимого изменения динамики роста клеток, в сравнении с контрольной группой, находящейся в CO₂-инкубаторе. Для определения долгосрочного (3 суток) влияния ПМП, условия были модифицированы для обеспечения постоянной поддержки 5% CO₂. Было показано, что жизнеспособность и динамика роста клеток линии MNNG-HOS и мезенхимальных стволовых клеток пульпы зуба человека линии DPSC не менялась в сравнении с контрольной группой, находящейся в CO₂-инкубаторе.

Полученные нами результаты показали, что ПМП не оказывают влияния на жизнеспособность и динамику роста субстратзависимых клеток. Следующим этапом будет исследование воздействия ПМП на пьезоэлементы нанокompозитных матриц с нанесёнными клетками для оценки возможности регенерации косной ткани.



РОЛЬ МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ ПЕПТИДА БЕТА-АМИЛОИДА В АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРНОЙ ФУНКЦИИ Na, K-АТФазы

**Петрушанко И.Ю., Барыкин Е.П., Стрелкова М.А., Тверской А.М., Петровская А.В.,
Анашкина А.А., Толстова А.П., Аджубей А.А., Митькевич В.А., Макаров А.А.**

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

maria7873878@gmail.com

Болезнь Альцгеймера (БА) – самое распространенное нейродегенеративное заболевание в мире, приводящее к снижению когнитивных функций пациентов и прогрессирующей деменции. Согласно амилоидной гипотезе, нейродегенерация при БА вызвана нарушениями метаболизма и накоплением в тканях мозга пептида бета-амилоида (Абета). Абета способен связываться с целым рядом белков на поверхности клеток и изменять их функционирование. Наиболее патогенным действием обладают олигомеры. Одной из мишеней действия Абета является Na,K-АТФаза, создающая трансмембранный градиент Na⁺ и K⁺. Ингибирование Na,K-АТФазы олигомерами Абета(1-42) вносит вклад в развитие нейрональной дисфункции при БА. Однако физиологическая роль взаимодействия мономерной формы Абета(1-42) с Na,K-АТФазой остается неясной.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что мономерная форма Абета(1-42) связывается с внеклеточным участком Na,K-АТФазы в соотношении 1:1. В ходе каталитического цикла Na,K-АТФаза совершает конформационные переходы. Нами установлено, что термодинамические параметры связывания Абета(1-42) с различными конформациями фермента (E1, E2 и E2P) близки, константы диссоциации составляют 1-2 мкМ. Таким образом, Абета способен связываться с Na,K-АТФазой в любой конформации, в отличие от специфического лиганда Na,K-АТФазы кардиотонического стероида убаина, связывающегося с высоким сродством только с белком в конформации E2P. Известно, что Na,K-АТФаза не только насос, но и рецептор кардиотонических стероидов, связывание с которыми приводит к активации Src-киназы вследствие диссоциации ее киназного домена из комплекса с Na,K-АТФазой. На системе *in vitro* нами было выявлено, что связывание Абета(1-42) с Na,K-АТФазой приводит к высвобождению киназного домена Src-киназы и активации киназы. Таким образом, Na,K-АТФаза может выступать в роли рецептора к мономерной форме Абета(1-42). Обратный пептид Абета(42-1) не приводит к активации Src-киназы, что подтверждает специфичность Абета-индуцированной активации Src-киназы. Выявлено, что связывание Абета(1-42) с Na,K-АТФазой не нарушает связывания фермента с убаином. Это соответствует данным молекулярного моделирования, свидетельствующим о различных участках связывания этих лигандов.

Таким образом, бета-амилоид, связываясь с Na,K-АТФазой, вызывает активацию Src-киназы, ассоциированной с ферментом, подобно специфическому лиганду Na,K-АТФазы убаину. Однако, в отличие от убаина, амилоид способен связываться с Na,K-АТФазой, находящейся в различных конформациях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30007).



DATA DEPENDENT (DDA) И DATA INDEPENDENT ACQUISITION (DIA)
СКОРОСТРЕЛЬНАЯ ПРОТЕОМИКА КАК КОМПЛИМЕНТАРНЫЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ
СРАВНЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ОСТЕОГЕННОЙ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ОСТЕОБЛАСТОВ И ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК
АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА ЧЕЛОВЕКА

**Тараскин И.А., Хижина А.А., Постникова К.Н., Зайнуллина Б.Р.,
Малашичева А.Б., Лобов А.А.**

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

taraskin.ia@phystech.edu

Скорострельная протеомика – один из ключевых «омиксных» методов, методология которого быстро развивается. В классической data dependent acquisition (DDA) протеомике используется тандемная масс-спектрометрия с конкурентным выбором наиболее обильных ионов, что приводит к потере большого количества данных. Для решения этой проблемы были разработаны различные подходы, среди которых data independent acquisition (DIA) протеомика. В этом случае происходит систематическая изоляция и фрагментация целых фрагментов спектра, вместо отдельных ионов. Это позволяет сохранять информацию обо всех ионах, но приводит к сложно-интерпретируемым спектрам. Масс-спектрометры серии TimsToF (Bruker) с ионной подвижностью — это одна из технологических платформ, на которой возможна реализация этих двух подходов. Однако опубликованы лишь единичные сравнения эффективности DDA и DIA протеомики на базе TimsToF, проведенные главным образом на тестовых образцах.

Цель работы – сравнительный протеомный анализ реальных биологических образцов при помощи DDA и DIA подходов на масс-спектрометре TimsToF Pro. В качестве биологической задачи было выбрано сравнение молекулярных механизмов нормальной (остеобласты) и патологической (интерстициальные клетки аортального клапана, ИКК) остеогенной дифференцировки *in vitro* ($n = 5$). После выделения первичных культур, клетки культивировали в стандартных и остеоиндуктивных условиях, затем проводили выделение белка и стандартную переподготовку для скорострельной протеомики.

DIA подход позволяет получить более высокое покрытие протеома. Количество идентифицированных белковых групп составляет 5436 для DDA и 7883 для DIA. Эта разница сохраняется и после фильтрации данных: для дальнейшего анализа было использовано 3239 белковых групп для DDA и 4439 для DIA подхода. Примечательно, что только 40% всех обнаруженных белков были идентифицированы обоими методами.

Кластеризация изученных образцов на основе протеомных данных демонстрирует аналогичный паттерн. Мы видим четыре четких кластера, соответствующих исходным биологическим группам в обоих случаях. В то же время мы выявили значительные различия в дифференциально экспрессируемых белках между контрольными и дифференцированными клетками, обнаруженными разными подходами.

Таким образом, оба метода позволяют выявить белки, ассоциированные с изучаемыми нами биологическими процессам, однако, эти подходы скорее комплиментарные, а не взаимозаменяемы.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ № 18-14-00152-П.



ГЛУТАМАТ КАК ФОНОВЫЙ РЕГУЛЯТОР СОЦИАЛЬНОГО ПОВЕДЕНИЯ

Таргош П.Г.¹, Глазко В.И.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия;

²ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства
имени В.А. Афанасьева, пос. Родники, Россия

targoshpolina@mail.ru

Социальное поведение является сложной структурой, состоящей из многих компонентов, имеющие свою иерархию. В её основе лежат гены, некоторые контролируют дифференциацию и специализированные функции клеток нервной системы, другие – сигнальные пути и нейронные связи. На неспециализированный контекст реализации этих функций обращают мало внимания. Однако, он вносит свой вклад в такие сложные системы, как социальное поведение. Чтобы подойти к выяснению элементов этого поведения и построению генных сетей, тесно связанных с его контролем, произведен сравнительный анализ формирования таких элементов в онтогенезе и их видовой изменчивости.

На основании литературных данных, создана база по генам, изменчивость которых ассоциирована с таким компонентом социального поведения, как агрессивность. В анализ включены гены, тесно связанные с агрессивным поведением у человека, собаки, рыбок Данио, крупного рогатого скота и домовый мыши. Используя метод построения генных сетей программы STRING, выполнен анализ межгенных взаимодействий, входящих в общие и отдельные метаболические пути. Оказалось, что у всех рассмотренных видов входят гены, кодирующие рецепторы к глутамату, который играет ключевую роль в регулировании скорости проведения нервного импульса. Выделено особое значение 2 генов, связанных с глутаматергической передачей сигналов, запускающей реактивные процессы агрессивных реакций. Впервые были получены данные, позволяющие предположить, что такие гены, которые влияют на скорость проведения нервного импульса, не имея тканевой и органной специфики, могут являться существенным фоном, который меняет реализацию специализированных функций. Ген *grik3* – функционирует как лиганд ионный канал в ЦНС, играет важную роль в возбуждающей синаптической передаче.

Изучение селективных различий между агрессивной и ручной породами КРС, дает предположить, что повышенная возбуждающая сигнализация, играет роль в повышенной реактивной агрессии [1]. Ген *gria2* (кодирует субъединицу глутаматного рецептора) – значимый участник процесса возбуждения ЦНС. Его блокировка у грызунов снижает агрессивность по сравнению с теми, у которых глутаматные рецепторы нормально функционируют [2].

Литература.

1. Eusebi, P.G. et al. Detection of selection signatures for agonistic behaviour in cattle. // *Journal of Animal Breeding and Genetics*. – 2018; 00:1–8.
2. Vekovischeva, O.Y. et al. Reduced aggression in AMPA-type glutamate receptor GluR-A subunit-deficient mice. // *Genes Brain Behav.* – 2004; 3:253-265.



НОВЫЙ КЛЕТОЧНЫЙ БИОСЕНСОР СЕРОТОНИНА

Черкашин А.П., Быстрова М.Ф., Рогачевская О.А.

ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

a.p.cher@yandex.ru

Серотонин – один из основных нейромедиаторов, который квантово высвобождается в ответ на стимуляцию клеток разного рода. Изучение выброса серотонина из отдельной клетки в физиологических экспериментах *in vitro* означает необходимость детектировать наномолярные концентрации серотонина в локальном участке экспериментальной камеры, и методологически это может быть решено с помощью клеток-сенсоров, экспрессирующих экзогенный рецептор серотонина. Эффекты серотонина опосредованы по крайней мере одним семейством лиганд-управляемых ионных каналов (5-НТ3) и 13 различными GPCR рецепторами из семейства типа А (5-НТ1, 5-НТ2 и 5-НТ4-7), которые подразделяются на классы на основе структурных и функциональных особенностей. Так же 5-НТ рецепторы сопряжены с разными G-белками и активируют разные сигнальные каскады внутри клетки.

Ранее в нашей лаборатории был создан клеточный сенсор серотонина на базе клеток СНО и серотонинового рецептора 5-НТ2С, сопряженного с системой мобилизации внутриклеточного кальция через Gq/G11 белки, характеризующегося низким порогом активации (наномолярные концентрации серотонина) и коротким временем инактивации. Клетки-сенсоры СНО/5-НТ2С, реагировали на появление серотонина в растворе повышением внутриклеточного Ca²⁺, что достаточно легко визуализировалось с использованием флуоресцентных Ca²⁺-зондов и микрофотометрии. Порог чувствительности полученных клеток составил 1 нМ, и нам удалось многократно задетектировать выброс серотонина из отдельных вкусовых клеток III типа, где серотонин является основным нейромедиатором. Однако наши эксперименты показали, что кривая доза-ответ клеток-сенсоров СНО/5-НТ2С характеризуется большим углом наклона и фактически полученный сенсор реагирует на появление нейромедиатора по принципу «все или ничего», что не позволило нам исследовать изменения в объеме серотонина, секретирующегося из вкусовых клеток при разной стимуляции. Подобными физиологическими характеристиками обладали и другие серотониновые рецепторы, сопряженные с мобилизацией кальция (5-НТ1А и 5-НТ1В).

Мы предположили, что дозозависимость клеточных ответов, генерируемых активацией серотониновых рецепторов будет более выражена в интересующем нас диапазоне концентраций при активации других сигнальных каскадов, например, аденилатциклазного. On-line визуализация этого каскада в физиологическом эксперименте стала возможна относительно недавно, с появлением генетически кодируемых сенсоров, в частности белка pFlamindo, флуоресценция которого зависит от концентрации cAMP в клетке. Нами был создан новый серотониновый сенсор, на основе клеток НЕК293, флуоресцентного белка pFlamindo и серотонинового рецептора 5НТ4, сцепленного через Gs-белок с аденилатциклазным каскадом. Полученные клетки НЕК293/pFlamindo+5НТ4 реагировали на появление уже 2 нМ серотонина в растворе повышением флуоресценции белка pFlamindo, максимум ответов достигался при 20 нМ серотонина, так же полученные клетки-сенсоры обладали высокой степенью селективности. Таким образом, полученный сенсор НЕК293/pFlamindo+5НТ4 характеризуется выраженной кривой доза-ответ в диапазоне ХХ-НН, что позволило нам более детально исследовать секрецию серотонина из вкусовых клеток в разных физиологических условиях и при различных вариантах стимуляции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-10068.



ВКЛАД DAG-ЗАВИСИМОГО ВХОДА Ca^{2+} В ТРАНСДУКЦИЮ ВКУСОВЫХ СИГНАЛОВ

Черкашин А.П., Фадеев П.Ю., Рогачевская О.А.

ФГБУН ФИЦ ПНЦБИ РАН Институт биофизики клетки РАН, Пушчино, Россия

pfadeev1991@vk.com

Основными хемосенсорными клетками вкусовой почки, распознающими горькое, сладкое и аминокислоты являются вкусовые клетки типа II. Современная концепция вкусовой трансдукции предполагает следующую цепочку событий: вкусовой стимул связывается с T1/T2 рецептором, что стимулирует фосфолипазу PLC β 2 и приводит к гидролизу PIP2 до двух вторичных медиаторов IP3 и DAG. Далее, IP3 активирует IP3 рецепторы, инициируя выброс депонированного Ca^{2+} с последующей активацией Ca^{2+} -зависимых катионных каналов TRPM5, деполяризацией плазмалеммы, генерацией потенциалов действия, открытием потенциал-зависимых каналов CALHM1 и выбросом АТФ (неканонический механизм нейротрансдукции без формирования классических химических синапсов). Согласно этому DAG может считаться побочным продуктом, однако в других сенсорных системах внутриклеточные Ca^{2+} -сигналы генерируются и за счет входа наружного Ca^{2+} через ионные каналы, например, в сенсорных нейронах вомероназального органа в процессе трансдукции происходит вход наружного Ca^{2+} через DAG-активируемые каналы TRPC2. Наши эксперименты свидетельствуют о том, что DAG-регулируемый вход Ca^{2+} может играть значительную роль и во вкусовой трансдукции.

В микрофотометрических экспериментах мы наблюдали Ca^{2+} ответы вкусовых клеток типа II в ответ на аппликацию горьких стимулов, причем, эти Ca^{2+} -ответы сильно зависели от концентрации наружного Ca^{2+} и развивались медленно в течение 50-100 с. Электрофизиологические исследования показали, что из вкусовых клеток, генерировавших входящие токи в ответ на аппликацию горьких стимулов, большинство также ответило на OAG (проникающий аналог DAG) генерацией входящих токов. Наличие токовых ответов на OAG, сходных по профилю и кинетике с ответами на вкусовой стимул, говорит об участии DAG во вкусовой трансдукции и функционировании на апикальной поверхности вкусовых клеток II типа DAG-активируемого Ca^{2+} -канала. Скорее всего, наблюдаемые Ca^{2+} ответы на вкусовые стимулы были результатом локального Ca^{2+} -входа, инициируемого DAG.

Мы предполагаем, что в процессе трансдукции вкусового сигнала IP3-управляемое высвобождение Ca^{2+} формирует начальный Ca^{2+} -сигнал, обеспечивающий быструю активацию TRPM5 и формирующий начальную фазу рецепторного потенциала. DAG регулируемый вход Ca^{2+} через TRPC2, возможно, в комбинации с SOC каналами, продлевает Ca^{2+} сигнал для сохранения активности TRPM5, тем самым определяя продолжительность рецепторного потенциала.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-01035.



МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

ГИБРИДНЫЙ ОЛИГОМЕРНЫЙ БЕЛОК ADGroEL-SacSm: ИНЖЕНЕРИЯ, ИССЛЕДОВАНИЕ, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ

**Михайлина А.О., Леконцева Н.В., Марченков В.В., Ильина Н.Б.,
Катина Н.С., Балобанов В.А.**

ФГБУН Институт белка РАН, Пушчино, Россия

uralm62@rambler.ru

Комбинация и перегруппировка доменов является одним из основных путей эволюции белков. Объединение доменов белков в качестве строительных блоков обеспечивает удивительное разнообразие функциональных комбинаций в живых организмах. Тот же самый путь привлекателен и для белковой инженерии. Комбинация нескольких доменов может дать результаты, которые превосходят сумму их свойств по отдельности. В нашей работе мы применили такой подход к олигомерным белкам, создав гибридный гептамерный белок из апикального домена шаперона GroEL (ADGroEL) и термостабильного Sm-подобного белка из *Sulfolobus acidocaldarius* (SacSm). ADGroEL не образует олигомерных структур и крайне неэффективен в качестве шаперона. SacSm является гипертермостабильным гептамерным РНК-связывающим белком. Мы провели анализ структур этих белков и спроектировали соединяющий их линкер. Этим линкером мы объединили белки в единую полипептидную цепь. Спроектированный гибридный белок был получен и исследован различными физико-химическими методами. Исследования показали, что он обладает термостабильностью выше, чем исходный ADGroEL и выше чем полноразмерный GroEL. При этом полученный гибридный белок связывает ненативные белки, связываемые полноразмерным GroEL. Также он снижает агрегацию ряда белков при их нагревании, что подтверждает его шаперонную активность. Полученный результат показывает, что выбранный нами путь инженерии позволил создать эффективный термостабильный шаперон. Этот белок может быть использован для ряда молекулярно-биологических задач, требующих предотвращения агрегации белков.

Работа поддержана грантом РФФ 22-24-00934.

ОЦЕНКА ПОДАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ СЕМЕЙСТВА IВ АНТИРЕСТРИКЦИОННЫМ БЕЛКОМ ARDV НА ПРИМЕРЕ ESOAI

Алехин В.А., Кудрявцева А.А.

ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

alekhin.va@phystech.edu

В работе было впервые изучено влияние антирестрикционного белка ArdV на активность системы рестрикции-модификации ESOAI, относящейся к рестриктазам I типа (семейство IВ).



Клетки *Escherichia coli* штамма TG1 были трансформированы плазмидами, несущими гены субъединиц рестриктаз I типа (исследуемой EcoAI или контрольной EcoKI), а также антирестрикционных белков (исследуемого ArdV или контрольного ArdA). В качестве гена *ardB* был использован ген из конъюгативной плазмиды R64, EcoAI экспрессировалась с плазмиды pAM35. Активность ArdV и ArdA в отношении рестриктаз оценивалась с помощью высевов фага λ на культуры полученных клонов-носителей плазмид с последующим подсчетом числа негативных колоний.

В ходе первой серии экспериментов белок ArdV был экспрессирован с Plac-промотора (использовалась ранее полученная в нашей лаборатории плаزمиды pTZArdV). В качестве положительного контроля использовались клетки, несущие плазмиду pUCArdA, в которой ген *ardA* стоит также под Plac-промотором. По результатам поставленных экспериментов были получены следующие значения эффективности посева фага на клоны штамма TG1: TG1 – 32 единицы; TG1 pAM35 pTZArdV – 4,9; TG1 pAM35 pUCArdA – 3,2 (приведено среднее значение результатов двух экспериментов, за единицу принята эффективность посева фага на клетки TG1 pAM35).

Для дополнительного подтверждения полученных результатов было принято решение о постановке экспериментов с использованием более сильного промотора, обуславливающего большую концентрацию и более высокий уровень активности исследуемого белка в клетке. Ген *ardB* был вставлен в плазмиду с сильным рамноза-индуцибельным промотором, полученной конструкцией трансформировали клетки штамма TG1. По результатам второй серии экспериментов была показана следующая эффективность посева фага на клоны штамма TG1: TG1 – 22 единицы; TG1 pAM35 pRha::ArdV (с индукцией промотора рамнозой) – 12; TG1 pAM35 pRha::ArdV (без индукции) – 4,1 (приведено среднее значение результатов двух экспериментов, за единицу принята эффективность посева фага на клетки TG1 pAM35). В качестве положительного контроля в данном случае использовался клон штамма TG1, трансформированный плазмидами pACYCEcoKI и pRha::ArdV; он сравнивался с клоном TG1 pACYCEcoKI, и для него также была выявлена высокая антирестрикционная активность ArdV.

На основании представленных выше данных можно сделать вывод, что белок ArdV, закодированный в плазмиде R64, проявляет антирестрикционную активность в отношении рестриктазы EcoAI.

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ У ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ

Андрющенко Н.В., Абрамова О.В., Зорькина Я.А., Морозова А.Ю., Павлов К.А.

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии
имени В.П. Сербского, Москва, Россия

nika.va2001@gmail.com

Шизофрения – одно из наиболее распространенных психических расстройств, характеризующихся сочетанием продуктивной (галлюцинаторно-бредовой, кататонно-гебефренной, аффективной, др) и негативной (апатия, абулия, алогия, эмоциональная и социальная отгороженность, др) симптоматики, поведенческих и когнитивных нарушений (памяти, внимания, мышления, др), заболевание, которое приводит к неблагоприятным социальным и экономическим последствиям.



Поскольку гены считаются значительным фактором риска шизофрении, некоторое понимание этой сложной области исследований необходимо во многих клинических контекстах. В настоящее время особенно актуальны молекулярно-генетические исследования шизофрении, направленные на поиск однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), связанных с заболеванием. Валидация потенциальных ДНК-маркеров необходима для разработки шкал полигенного риска, которые предполагают оценку общего вклада генов и могут быть использованы для прогнозирования развития патогенеза.

Целью нашей работы было проанализировать встречаемость некоторых генетических полиморфизмов у больных шизофренией и контрольной выборки. В исследование были включены 61 пациент с диагнозом шизофрения в соответствии с МКБ-10 (F20) и 196 человек в контрольной группе. По данным литературы и баз данных dbSNP, SNPinfo для анализа были отобраны гены-кандидаты. Среди них присутствуют полиморфизмы генов, которые ранее были использованы в полногеномных исследованиях и показывали наличие ассоциации с патогенезом: DRD2(rs1800497), MAOA (rs3027407), MAOB (rs1799836), а также полиморфизмы с меньшей доказательной базой KCNIP4 (rs358592), OXTR (rs53576), COQ8A (rs3806263), TMEM132C (rs7296262-T).

ДНК, полученная в ходе выделения из образцов крови, использовалась для ПЦР генотипирования выборок с целью изучения частоты этих генотипов у больных шизофренией с помощью постановки ПЦР в реальном времени с использованием технологии TaqMan зондов и статистического анализа с помощью программы SNPstat. По результатам исследования нами были выявлены однонуклеотидные полиморфизмы потенциально связанные с патогенезом шизофрении, среди них rs1052873-C в гене ESCO2 и rs358592 в гене KCNIP4.

Работа выполнена при поддержке гранта АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» 2707-2 «Разработка методики объективной диагностики риска психических расстройств на основе липидного анализа плазмы крови» научно-практический проект в сфере медицины.

СВЯЗЬ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА UCP С КАРДИОМЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Артемova В.Д.^{1,2}, Праведникова А.Э.^{1,2}, Шидловский Ю.В.^{1,2}

¹ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

valeryartemova.va@gmail.com

В исследованиях последних лет полиморфизмы в генах белков семейства UCP (uncoupling protein) часто ассоциируют с предрасположенностью к развитию кардиометаболических заболеваний (КМЗ). Все UCP белки локализованы на внутренней мембране митохондрий и участвуют в разобщении окислительного фосфорилирования, что приводит к высвобождению энергии в виде тепла. Ген UCP1 является маркером бурой жировой ткани, снижение её активности может приводить к увеличению массы тела, что значительно повышает риск развития КМЗ. Ген UCP2 в человеческом организме наиболее



активно экспрессируется в клетках белой жировой ткани, скелетной мускулатуры, сердца, сосудов, легких, селезенки, тимуса, клетках иммунной системы. UCP3 присутствует преимущественно в скелетной мускулатуре и в кардиомиоцитах. Ожирение и диабет 2 типа часто сопровождаются формированием в митохондриях реактивных форм кислорода и накоплением липидов в кардиомиоцитах, гепатоцитах и клетках скелетной мускулатуры. UCP2 играет роль в регуляции метаболизма свободных жирных кислот и предотвращении клеточной гибели в результате влияния реактивных форм кислорода, что является приспособительным механизмом при заболеваниях. В связи с тем, что исследования разных популяций предоставляют противоречивые результаты касательно ассоциации полиморфизмов UCP1-3 с развитием КМЗ, необходимы дальнейшие исследования разных этнических групп.

Данная работа посвящена исследованию потенциальной связи полиморфизмов генов UCP1-3 с КМЗ в российской выборке. Были сформированы две группы: основная – пациенты, страдающие КМЗ (N=310), и контрольная – участники без КМЗ (N=255), получены препараты геномной ДНК. Ранее мы провели генотипирование по четырем однонуклеотидным полиморфизмам гена UCP1 (rs10011540, rs1800592, rs3811791, rs45539933) методом ПЦР в режиме реального времени с использованием флуоресцентно меченых зондов TaqMan, исследовали частоту генотипов и аллелей указанных полиморфизмов в двух группах и не обнаружили статистически значимой ассоциации их с риском развития КМЗ.

В настоящий момент мы продолжаем исследование по поиску ассоциаций и проводим генотипирование по однонуклеотидным заменам в генах UCP2 (rs660339) и UCP3 (rs1800849). Дальнейший поиск генетических маркеров КМЗ, характерных для разных популяций, может помочь в разработке новых подходов к лечению и ранней диагностике этих патологий.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДЕРНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТОВ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ МОЖЖЕВЕЛЬНИКА ОБЫКНОВЕННОГО (*JUNIPERUS COMMUNIS* L.)

Бессонова В.А.^{1,2}, Хантемирова Е.В.¹

¹ФГБУН Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО Уральский федеральный университет

имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

bessonova-varechka@mail.ru

Можжевельник обыкновенный *J. communis* – широкоареальный вид сем. *Cupressaceae*, обладающий свойствами холодостойкости, морфологической пластичности. В европейской части ареала *J. communis* значительно сократил свою численность в результате антропогенной деятельности. На основе знаний о генетическом разнообразии популяций возможна реконструкция истории расселения вида и разработка программ по сохранению биоразнообразия.

В данной работе были использованы те же выборки, что и для хлоропластной ДНК [1]. Они были проанализированы с помощью ядерных микросателлитов. Ставились цели оценить закономерности генетического разнообразия, степень дифференциации популяций на всем ареале.



При анализе изменчивости 7-ми микросателлитных локусов (21 популяция, 315 образцов) выявлено 156 аллельных вариантов. Большинство локусов были полиморфными во всех выборках. Число уникальных аллелей составило 36.

Популяции можжевельника демонстрируют высокое внутривидовое разнообразие ($H_e = 0.537-0.807$). При этом и по хлоропластным, и по ядерным маркерам самые высокие значения генетического разнообразия были в наиболее северных популяциях, что является доказательством существования в прошлом у этого вида северных перигляциальных микроареалов.

Средние показатели генетического разнообразия, полученные в нашей работе, сравнимы с теми, что обнаружены в европейских популяциях. Это может объясняться происхождением последних от исторически больших и взаимосвязанных популяций. Эти популяции демонстрировали высокие положительные значения коэффициента инбридинга, свидетельствующие о дефиците гетерозигот [2,3]. В нашем исследовании были получены аналогичные значения коэффициента инбридинга. Наличие нулевых аллелей влияет на значения FIS в изученных популяциях, но не на общую генетическую структуру. Другие факторы, вероятно, также вносят свой вклад в наблюдаемую закономерность в коэффициентах инбридинга.

Литература.

1. Hantemirova E. et al., (2017) A new Eurasian phylogeographical paradigm? Limited contribution of southern populations to the recolonization of high latitude populations in *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *Journal of Biogeography* 44.
2. Oostermeijer, J., Knecht, Bart. (2004). Genetic population structure of the wind-pollinated, dioecious shrub *Juniperus communis* in fragmented Dutch heathlands. *Plant Species Biology*. 19.
3. Jacquemart, A.-L. et al., (2021). Using genetic evaluation to guide conservation of remnant *Juniperus communis* (Cupressaceae) populations. *Plant Biology*, 23.

ЗАВИСИМОСТЬ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR И IRAP МАРКЕРОВ ОТ ГЕНОМНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

Апашкин П.С.¹, Блохин И.Г.^{1,2}

¹НОЧУ ВО Московский финансово-промышленный университет «Синергия»,
Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет
– МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

pavel.ap.97@gmail.com

Микросателлиты и ретротранспозоны являются наиболее полиморфными участками генома и удобными инструментами для описания популяционно-генетической структуры разных видов (Блохин, Глазко, 2021; Календарь, Глазко, 2002). Одной из проблем использования таких маркеров в популяционно-генетических исследованиях являются отличия в полиморфизмах спектров продуктов амплификации, полученных в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Можно ожидать, что полиморфизм таких фрагментов будет зависеть



от локализации участков гомологии к праймерам в экзонах и интронах различных генов. В данном исследовании проведен сравнительный анализ экспериментально выявленного полиморфизма спектров продуктов амплификации у разных таксонов, таких как домашняя собака *Canis familiaris* (Linnaeus, 1758) и прыткая ящерица *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758), а также локализации участков гомологии к используемым в ПЦР праймеров в кодирующих и некодирующих последовательностях.

У прыткой ящерицы в ее референтном геноме участки гомологии к последовательностям (GAG)₆C и (TGC)₆C, формирующим наименее полиморфные спектры фрагментов ДНК, при их использовании в качестве праймеров в ПЦР, локализуются в экзонах таких генов, как ITPKB и ZNF653, участвующих в регуляции процессов кроветворения. Участки гомологии к таким праймерам, как фрагменты ретротранспозонов Sabrina и SIRE-1, формирующим наиболее полиморфные спектры в ПЦР, локализовались в интронах генов C1QL4 и COL9A1, вовлекающихся в регуляцию таких процессов, как сборка молекул коллагена.

У домашней собаки участки гомологии к праймерам, формирующим как высоко-, так и низкополиморфные спектры в ПЦР при экспериментальных исследованиях, в референтном геноме домашней собаки локализуются только в интронах. Полученные данные позволяют полагать, что на выявленный полиморфизм геномных участков у разных видов определенное влияние могут оказывать их локализация в экзонах и интронах, а также вовлеченность в регуляторные сети, связанные с функциональными характеристиками соответствующих структурных генов.

ПАРАЛЛЕЛИЗМ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПРЫТКОЙ ЯЩЕРИЦЫ

Блохин И.Г.

ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет
– МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

blokhin.ivan96@gmail.com

Традиционным методом оценки состояния популяций прыткой ящерицы является анализ морфометрических параметров, характеристик щиткования и окраски. Несмотря на большое количество соответствующих исследований, многие аспекты фенотипической изменчивости остаются дискуссионными, а эколого-географические факторы могут контролировать разные фенотипические характеристики прыткой ящерицы, что необходимо учитывать при описании популяционных особенностей животных. Ещё одним способом оценки состояния популяции, позволяющим получать информацию о динамике популяционно – генетической структуры животных в связи с разными условиями воспроизводства, является анализ молекулярно-генетической изменчивости с использованием участков геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов и мобильных генетических элементов. Функциональная значимость таких генетических структур остаётся недостаточно изученной, как и их связь с изменчивостью фенотипических признаков. В данной работе проведено сопоставление изменчивости фенотипических и молекулярно-генетических признаков прыткой ящерицы двух локалитетов.



При полилокусном генотипировании ящериц двух локалитетов генетические дистанции между всеми особями, а также между самками и самцами ящериц одного локалитета с использованием праймеров Sabrina и Sire 1 оказались близки по значениям, при этом в дифференциацию ящериц вовлекались схожие морфометрические признаки (такие как длина пилеуса, ширина головы, длина передней и задней конечности и т.д.). Генетические дистанции между самками ящериц с использованием праймера (GAG)₆C превысили дистанции между самцами, при этом между самками было выявлено большее количество отличий по морфометрическим признакам и признакам фоллидоза. В дифференциацию самок и самцов ящериц вовлекались такие морфометрические признаки, как ширина анального щитка и длина ступни. Помимо этого, расстояния Махаланобиса, рассчитанные по морфометрическим признакам и признакам щиткования между группами ящериц, совпадали с результатами генотипирования: генетические дистанции, рассчитанные между самцами ящериц двух локалитетов по праймерам Sabrina, Sire 1, (ACC)₆T, (TGC)₆C, превышали генетические дистанции между самками, расстояния Махаланобиса между самцами также оказались больше, чем между самками по всем фенотипическим характеристикам.

Сопоставление результатов анализа фенотипической и молекулярно-генетической изменчивости позволяет предполагать, что существует ассоциация между изменчивостью молекулярно-генетических признаков и отдельных фенотипических характеристик.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАШИН ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ НА УРОВНЕ РНК

Бобков Г.А.¹, Недорезова Д.Д.¹, Дубовиченко М.В.¹, Колпащиков Д.М.²

¹ФГАОУ ВО Национальный исследовательский институт ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

²Университет центральной Флориды, Орландо, США

bobkov@scamt-itmo.ru

ДНК-машины на основе ДНКзимов позволяют эффективно расщеплять РНК-мишени. Дополнительные «руки» помогают раскручивать вторичную структуру РНК, открывая сайты расщепления для ДНКзима.

Введение. Генная терапия – одно из многообещающих направлений в современной биомедицине. На настоящий момент существует три основных метода разрушения РНК с помощью таких агентов как: антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), малые интерферирующие РНК (миРНК) и ДНК-зимы. Каждый из представленных агентов имеет собственные положительные и отрицательные особенности: АСО позволяет уменьшать экспрессию генов, также, как и усиливать целевую трансляцию; миРНК более сильнодействующий инструмент, в сравнении с АСО, но при этом более токсичный; ДНК-зимы – ионозависимый инструмент. Все эти инструменты обладают общим недостатком, они не эффективно расщепляют РНК-мишени в силу наличия вторичной структуры РНК. Одним из возможных решений данной проблемы может быть использование дополнительных РНК-связывающих фрагментов («рук») у генно-терапевтических агентов.

Основная часть. ДНК-зимы – одноцепочечные олигонуклеотиды катализирующие химические реакции разрыва РНК. (Deoxyribozyme-Based DNA Machines for Cancer Therapy).



В данном исследовании мы разрабатываем ДНК-машины на основе ДНКзимов, к которым прикрепляются дополнительные руки. Объектом исследования являлся синтетический участок гена *infB*, отвечающего за синтез фактора инициации трансляции 2 (IF-2) у бактерии *Escherichia coli*.

Мы сравнивали работу ДНК-машин с разными длинами дополнительных «рук» и ДНКзимов, входящих в состав ДНК-машин. Опыты проводили в буфере, обладающим составом ионов близким к физиологическому (50 мМ KCl, 50 мМ HEPES, 15 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, pH = 7,4). Эксперименты проводились в условиях многократного оборота, при котором РНК-мишень находится в избытке над ДНКзимом (1 мкМ и 50 нМ, соответственно).

Выводы. Во всех экспериментах отмечалось увеличение скорости расщепления целевой РНК *infB* при включении ДНКв конструкцию ДНК-машины с дополнительными руками по сравнению с исходными ДНКзимами. Это объясняется повышением аффинности каталитического кода ДНКзима к РНК-мишени за счет дополнительных рук. В будущем предполагается поиск наилучшего дизайна и определение закономерностей для выбора последовательности нуклеотидов ДНК-машин для дальнейшего их использования в терапии генетических заболеваний.

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ МЯРНК НА СПЛАЙСИНГ В КЛЕТКАХ HeLa S3

Болихова А.К.¹, Марьясина С.С.², Мазур А.М.³, Донцова О.А.^{4,5,6}, Сергиев П.В.^{2,4,5}

¹Факультет биоинженерии и биоинформатики, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Институт функциональной геномики, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия;

⁴Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁵Центр наук о жизни, АНОО ВО Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия;

⁶ФГБУН Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

anastasia_b7@mail.ru

Сплайсинг является одним из ключевых этапов, обеспечивающих созревание молекул РНК в клетке. мяРНК, входящие в состав сплайсосомного комплекса, играют центральную роль в узнавании сайтов сплайсинга и вырезании интронов. Сплайсосомные мяРНК обладают сложной третичной структурой, которая образуется в ходе их созревания, поэтому даже малейшие изменения в процессинге мяРНК могут иметь значительное влияние на сплайсинг в целом. В данной работе мы постарались понять, как модификации сплайсосомных мяРНК влияют на сплайсинг. Анализ провели на примере двух модификаций: m²G72 в U6 мяРНК и m⁶Am30 в U2 мяРНК. В ходе исследования использовали три линии клеток: HeLa S3 дикого типа и две дочерные линии, полученные нокаутированием генов метилтрансфераз, отвечающих за указанные модификации. Высокопроизводительное секвенирование тотальной РНК из трех линий в сумме с биоинформатическим анализом позволило выявить разницу в



экспрессии генов и соотношении альтернативно-сплайсированных форм РНК. Результаты подтвердили с помощью ПЦР и ПЦР в реальном времени. Также оценили кинетику сплайсинга в изучаемых клеточных линиях. Для этого клетки в течение небольших промежутков времени инкубировали с этилиуридином, а затем с выделяли новосинтезированную РНК методами клик-химии. В результате удалось проследить изменение соотношения сплайсированной и несплайсированной форм РНК и оценить скорость сплайсинга. Таким образом было показано значительное влияние модификаций сплайсосомных мРНК на сплайсинг, а также качественно и количественно оценено это влияние.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-64-00006.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА КРАСНОЙ ЯПОНСКОЙ СОСНЫ ИЗ ПРЕФЕКТУРЫ ФУКУСИМА ПРИ ПОМОЩИ IRAP-МАРКЕРОВ

Бондаренко С.В.¹, Бондаренко В.С.², Бондаренко Е.В.², Гераськин С.А.²

¹МБОУ Средняя общеобразовательная школа номер 12, Обнинск, Россия;

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии,
Обнинск, Россия

bondserega04@gmail.com

Одиннадцать лет назад (11.03.2011) из-за случившегося в океане землетрясения с последующим цунами произошла авария на АЭС «Фукусима-дайичи» с выбросом радионуклидов в окружающую среду и эвакуацией более 100000 человек.

Красная японская сосна, формирующая монодоминантные леса в Японии, является радиочувствительным видом и хорошим объектом для изучения радиационных эффектов на молекулярно-генетическом и организменном уровнях. Образцы хвои для выделения ДНК отбирали с 4 импактных и одного контрольного участков. Мощность AMBIENTНОГО эквивалента дозы на контрольном участке составляет $0,25 \pm 0,05$ мкЗв · ч⁻¹, а на импактных варьирует от $3,4 \pm 0,1$ до $6,4 \pm 0,4$ мкЗв · ч⁻¹, в зависимости от участка.

ДНК выделялась набором Сорб-ГМО-Б (Синтол). Концентрация и качество полученных образцов ДНК оценивались на спектрофотометре NanoDrop. Для генотипирования исследуемых популяций использовались IRAP (interretrotransposon amplified polymorphism) праймеры, разработанные к длинным концевым повторам дифференциально экспрессируемых ретротранспозоноподобных фрагментов, выделенных из сосны обыкновенной после воздействия теплового стресса и повреждений насекомыми (Voropova и Rungis, 2014). При проведении ПЦР отжиг праймеров осуществлялся по методу «touch down» (68°C 1-ый цикл с понижением температуры в течение 16 циклов на 0,5°C/цикл до температуры 60°C, всего 60 циклов). Ампликоны разделяли с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в TAE буфере. Для визуализации ДНК использовался краситель SYBR Green и GelDoc Go Imaging System (BioRad). На основе электрофореграмм составляли бинарные матрицы, которые использовали для расчета генетического расстояния (по методике Nei & Li, 1979) с применением программы GenAlEx v.6.5.



Выбраны 2 наиболее информативных IRAP праймера, при использовании которых получено 23 ампликона длиной от 180 до 1500 пар нуклеотидов. Выявлено, что наиболее радиоактивно загрязненная популяция ($6,4 \pm 0,4$ мкЗв · ч⁻¹) выделяется наибольшим количеством ампликонов (12), в том числе 4 уникальными; процент полиморфных локусов в данной популяции составил 52 (39 в контроле). Показатель средней гетерозиготности, который положительно коррелирует с уровнем приспособленности организмов, также выше в этой популяции.

Таким образом, использованные IRAP маркеры представляются перспективными для оценки генетического разнообразия и мониторинга радиозоэкологического состояния природных популяций красной японской сосны.

РАЗРАБОТКА МИШЕННОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ УСТОЙЧИВЫХ ТИПОВ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

**Владимирова С.А.^{1,2}, Никотина А.Д.¹, Комарова Е.Ю.¹,
Маргулис Б.А.¹, Гужова И.В.¹**

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

snezhana.alexandrovna@mail.ru

Колоректальный рак является одним из наиболее часто встречающихся типов опухоли, при котором 5-летняя выживаемость в случае метастазирующей стадии составляет всего 14%. Отчасти это объясняется тем, что опухолевые клетки оказываются резистентными к имеющимся в клинике химиотерапевтическим препаратам. Преодолеть данный барьер позволяет комбинированная терапия, нацеленная на снижение дозы лекарства первой линии, достижение синергического эффекта, а также единовременное блокирование сразу нескольких онкогенных функций. Одной из мощных цитопротекторных систем раковой клетки, ответственной за развитие устойчивости к лекарствам, является система молекулярных шаперонов. В связи с этим все больше исследователей обращает внимание на использование ингибиторов белков HSPs и регулятора их синтеза, фактора HSF1, в качестве вспомогательных компонентов в противораковой терапии.

Целью данной работы был подбор терапии для лечения клеток рака прямой кишки, полученных от пациентов после резекции опухоли без предварительного лечения. С помощью методов иммуноблоттинга и системы xCELLigence была дана характеристика клеткам по их шаперонному статусу, способности к миграции и пролиферативной активности. Далее методом окрашивания на Annexin-V в сочетании с красителем PI, оценивали чувствительность полученных клеток к широкому спектру препаратов первой линии, активно используемых в схемах лечения. Результаты показали, что ни одно из лекарств не оказывало желаемого эффекта, поэтому подход сменили на поиск мишеных препаратов, к которым имеющиеся линии проявят чувствительность. С использованием ранее упомянутых методов было выявлено, что данные клетки чувствительны к активатору каспазы 3, веществу PAC-1, и к ингибитору аутофагии хлороквину (chloroquine). После этого методом иммуноблоттинга была проверена эффективность работы в отношении полученных линий ингибитора активности



HSF1, соединения CL-43, которое было открыто ранее в лаборатории. Для определения эффективности сочетанной терапии CL-43 с PAC-1/chloroquine был использован анализ цитотоксичности в системе xCELLigence, который показал, что комбинация ингибитора активности HSF1 и аутофагии дает синергетический эффект и приводит к эффективной гибели клеток на любой стадии опухолевой прогрессии.

Таким образом, единовременное блокирование системы протеостаза и аутофагии потенциально может оказаться эффективным в отношении пациентов с опухолями, которые характеризуются высокой экспрессией HSP70, HSF1, а также маркеров аутофагии.

РОЛЬ ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА В АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА ИНСУЛИНА (IR)

Гавриленкова А.А.^{1,2}, Деев И.Е.², Ганцова Е.А.², Бочаров Э.В.², Серова О.В.²

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

²ФГБУН Институт биоорганической химии имени ак. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

alycat1008@gmail.com

Рецептор инсулина, принадлежит семейству рецепторных тирозинкиназ (RTKs), которые играют ключевую роль в развитии и дифференцировке клеток. RTKs состоят из 3-х частей: внеклеточной части, которая отвечает за связь с лигандом, трансмембранного домена (ТМ), и внутриклеточной части, участвующей в фосфорилировании субстратов. На данный момент точные механизмы конформационных изменений рецепторов при их активации до сих пор выясняются. Предполагается, что в неактивном состоянии ТМ-домены рецептора инсулина находятся в конформации, препятствующей взаимодействию цитоплазматических частей молекулы. При связывании лиганда, конформация рецептора меняется, в результате внутриклеточные тирозинкиназные домены сближаются и фосфорилируют друг друга, вызывая клеточный ответ.

Нами получены конструкции, кодирующие IR с двойными аминокислотными заменами в трансмембранном домене: I951E-F952R; F956E-S957R; I960E-G961R. Далее данными конструкциями производилась трансфекция клеточной линии НЕК 293 и дальнейшая обработка клеток средой, содержащей инсулин. Клеточные лизаты анализировали методом вестерн-блота с антителами к фосфорилированной и общей форме рецептора инсулина. Мутации F956E-S957R; I960E-G961R не влияли на активацию инсулинового рецептора. А замена I951E-F952R приводила к автофосфорилированию рецептора даже при отсутствии лиганда, в отличие от рецептора дикого типа, который активируется только в присутствии инсулина. Предполагается, что двойная замена I951E-F952R приводит к стабилизации трансмембранного домена в активной конформации за счет образования солевых мостиков между глутаминовой кислотой и аргинином. На основе полученных данных мы провели анализ влияния одиночных замен I951E и F952R на автофосфорилирование рецептора. Одиночные мутации I951E и F952R также приводили к активации рецептора в отсутствие лиганда. Нами было установлено, что автофосфорилирование рецептора IR как с двойной заменой I951E-F952R, так и с одинарными заменами I951E и F952R в отсутствие инсулина



приводит к активации внутриклеточных сигнальных белков IRS-1 и ERK. Это свидетельствует о том, что данные замены в трансмембранном домене IR, вероятно, приводят к образованию функционально-активного димера рецептора в отсутствие лиганда.

Мы можем сделать вывод о том, что трансмембранный домен играет важную роль в активации IR, и даже точечные замены в его аминокислотной последовательности, могут приводить к значительным изменениям при активации рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) грант № 20-04-00880.

УСТАНОВЛЕНИЕ СПЕКТРА МУТАЦИЙ В ГЕНЕ АТР7В У ПАЦИЕНТОВ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ И ИЗУЧЕНИЕ КОРРЕЛЯЦИИ С ПРОЯВЛЕНИЯМИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Гарбуз М.М.¹, Овчинникова А.А.¹, Кумейко В.В.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия;

²ФГБУН Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Россия

garbuzmihail.93@gmail.com

Введение. Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК, WD) – это тяжелое аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное нарушением метаболизма меди, которое возникает в результате различных мутаций в гене АТР7В.

Цель работы. Целью работы явился поиск мутаций в гене АТР7В в выборке больных Приморского края и поиск корреляции между мутациями, полом, возрастом дебюта и течением болезни.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы ДНК 56 больных с подозрением на БВК. Поиск мутаций осуществлялся с помощью секвенирования по Сенгеру экзонов с 2 по 21 гена АТР7В.

Результаты и обсуждение. Секвенирование позволило выявить мутацию гена АТР7В у 54 из 56 обследованных больных (96%), среди которых оказалось практически равное соотношение мужчин и женщин, соответственно 30 (55%) и 26 (45%). Среди выявленных мутаций преобладали His1069Gln у 24 человек (44%), Glu1064Lys у 11 (20%) и 2304insC у 7 (13%). Реже встречались Ser 744Pro у 3 человек (5%), Arg1041Trp у 2 (4%), Arg 778Leu у 2 (4%), Gly710Ser у 3 (6%), 3402delC у 1 (2%) и Trp779* у 1 (2%). Средний возраст пациентов к моменту проведения секвенирования составил 24,5 года, к моменту первичного обращения за медицинской помощью – 19,6 лет, период врачебного наблюдения в среднем составил 8,9 лет. У пациентов с мутацией His1069Gln был зафиксирован более ранний дебют, в первые годы жизни (41%), реже первые симптомы проявлялись на втором десятилетии (31%), и ещё реже начиная от 30 лет (28%). У больных с мутациями Glu1064Lys и 2304insC болезнь дебютировала чаще на втором десятилетии (44%), реже в первые годы (31%) и после 30 (25%). К первичному обращению больных за медицинской помощью среди неврологических синдромов преобладали (в 40,9%) пароксизмальные состояния (среди них доля эпилептических достигала 95%). Реже (38%) первоначально появлялись моторные дефекты.



Значительно реже (21,1%), но более ярко на ранних этапах выступали дефекты поведения, признаки психических расстройств в обрамлении соматической патологии, эндокринно-гормональных расстройств, поражений кожи и патологии кроветворения. У пациентов с мутацией His1069Gln преобладали гиперкинезы (50%), у пациентов с мутациями Glu1064Lys и 2304insC, а также у пациентов с редкими мутациями преобладали пароксизмальные расстройства (62% и 58% соответственно). МРТ показало, что у пациентов с мутацией His1069Gln изменения головного мозга зафиксированы у 50%, у пациентов с мутациями Glu1064Lys и 2304insC – 68% и у пациентов с редкими мутациями 50%, при этом не удалось зафиксировать зависимость тяжести течения заболевания от степени изменений.

ОТВЕТ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКИХ ЧЕЛОВЕКА С НОКАУТОМ ГЕНА *POL1* НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

**Громова А.С.¹, Болдинова Е.О.¹, Шилкин Е.С.¹, Ким Д.В.²,
Чупров-Неточин Р.Н.³, Жарков Д.О.², Макарова А.В.¹**

¹ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

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

³ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (государственный университет),
Москва, Россия

grom-nast@yandex.ru

Для успешной передачи генетической информации клетка должна быстро и точно копировать свою ДНК. Повреждения ДНК изменяют структуру двойной спирали, что приводит к остановке репликации. Одним из механизмов восстановления репликации в поврежденных участках является транслезионный синтез – «синтез через повреждения». Однако транслезионный синтез вносит вклад в развитие устойчивости к препаратам химиотерапии, направленным на подавление репликации с помощью повреждения ДНК. Многие ДНК-полимеразы, осуществляющие транслезионный синтез, могут рассматриваться в качестве мишеней для повышения эффективности терапии онкологических заболеваний. В работе мы исследовали роль транслезионной ДНК-полимеразы Pol1 в ответе клеток на разные типы повреждений ДНК. Была получена гомозиготная линия клеток аденокарциномы легкого A549 с нокаутом гена *POL1*. Клетки с геном дикого типа (*POL1+/+*) и с нокаутом (*POL1-/-*) обрабатывали разными концентрациями ДНК-повреждающих агентов метилметансульфоната и перекиси водорода, а также химиотерапевтическими препаратами блеомицин и цисплатин. Оценку чувствительности клеток к повреждениям ДНК проводили по метаболической активности с помощью МТТ-анализа, пролиферативной активности с помощью включения EdU и мониторингу клеточного цикла. Нокаут гена *POL1* не оказал существенного влияния на метаболическую активность клеток в ответ на повреждения ДНК, однако вызвал задержку клеток в G1 в условиях окислительного стресса после обработки клеток перекисью водорода. Чувствительность нокаутных клеток к окислительному стрессу согласуется с участием Pol1 в репликации ДНК с повреждениями, индуцированными активными радикалами кислорода.

Работа поддержана грантами РФФ 18-14-00354 и 22-24-20156.



МУТАЦИИ В ГЕНАХ *IDH1* И *TP53* ВЫЗЫВАЮТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ГЛИОМ В СТОРОНУ ГЛИАЛЬНОГО РОСТКА

Гулая В.С., Шмелев М.Е., Жменя В.М., Кумейко В.В.

Школа наук о жизни, ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Владивосток,
Россия

gulaya.lera@gmail.com

Глиома – наиболее распространенная первичная опухоль головного мозга, характеризующаяся диффузным инфильтративным. Комбинация точечных мутаций в генах изоцитратдегидрогеназы типа 1 (*IDH1* – isocitrate dehydrogenase type 1) и опухолевого белка p53 (*TP53* – tumour protein 53) является маркерной для астроцитом (2я и 3я степень злокачественности глиом), при этом 41% пациентов, несущих любой тип мутации p53, вызывающий проонкогенную активность (мутация с усилением функции (GOF – gain of function)), также имеют мутантный *IDH1*. Широко известные *TP53* GOF расположены в участке ДНК-связывающего домена – R175, R248 и R273 и способствуют размножению глиомных стволовых клеток (ГСК), а мутация *IDH1* R132H приводит к блокировке генов дифференцировки. Мы предполагаем, что комбинация точечных мутаций *IDH1* и *TP53* могут индуцировать определенный фенотип ГСК, заметно отличающийся от фенотипов дикого типа. Целью данного исследования являлось определение влияния *IDH1* R132H и *TP53* GOF на дифференцировку, пролиферацию и миграцию ГСК. Материалом исследования послужили клетки и ядра, изолированные из опухолевой ткани пациентов с глиомами, несущими мутации *IDH1* R132H и *TP53* GOF, отсортированные по уровню экспрессии стволового маркера Sox2. Для молекулярного профилирования использовали метод секвенирования одиночных ядер SmartSeq2. Полученные данные анализировались с использованием биоинформатических продуктов для анализа секвенирования нового поколения (STAR, SingleCellExperiment, Seurat, Monocle, Scanpy, KEGG, IPA). Для проведения исследований на миграцию и пролиферацию использовали систему Cell-iQ MLF (CM Technologies, Finland). Анализ экспрессии стволовых маркеров (Sox2, Nestin, CD44) проводили с помощью конфокального микроскопа FluoView FV1200MPE-FV12M-5XX-3XX (Olympus, Japan). Мутация *IDH1* R132H в комбинации с точечными мутациями в гене *TP53* приводит к более дифференцированному фенотипу ГСК, смещенному в глиальный росток, по сравнению с ГСК дикого типа. Мутация *IDH1* R132H в сочетании с точечными мутациями гена *TP53* увеличивает миграционную способность за счет увеличенной экспрессии CD44 и продукции белков внеклеточного матрикса (коллагенов IX, XI и XVI). Данное исследование выделяет несколько предполагаемых механизмов, которые могут быть обращены против самих ГСК: (i) синтез коллагена, (ii) недостаточный синтез эндогенных липидов, (iii) продукция АТФ путем окислительного фосфорилирования, (iv) экспрессия антионкогенов. Данное исследование было поддержано грантом РФФ № 20-15-00378.



КОНСЕРВАТИВНЫЕ АМИЛОИДОГЕННЫЕ СВОЙСТВА НУКЛЕОПОРИНОВ С FG-ПОВТОРАМИ

**Данилов Л.Г.¹, Трубицина Н.П.¹, Суханова К.В.¹, Рогоза Т.М.^{1,2}, Тарасов О.В.¹,
Журавлева Г.А.^{1,3}, Бондарев С.А.^{1,3}**

¹Кафедра генетики и биотехнологии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт общей генетики РАН, Санкт-Петербургский филиал,
Санкт-Петербург, Россия;

³Лаборатория биологии амилоидов, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

lavrentydanilov@gmail.com

Амилоиды – это особая группа белковых агрегатов, обладающие высокой устойчивостью к действию детергентов и протеаз, а также способностью индуцировать переход некоторых белков из растворимой формы в агрегированную форму. Ранее было описано множество функциональных амилоидов, которые принимают участие в различных биологических процессах. Одним из примеров функциональных амилоидов является белок СРЕВ, амилоидные агрегаты которого играют важную роль в формировании долговременной памяти у *Aplysia californica*, *Drosophila melanogaster* и *Mus musculus*. В нашем исследовании мы предполагаем, что список функциональных кандидатов в амилоиды может быть расширен ортологичными белками, которые обладают консервативными областями с амилоидными свойствами. Перспективным примером являются нуклеопорины с FG-повторами. У их ортологов из разных видов были ранее обнаружены амилоидные свойства. Мы предполагаем, что эта особенность может быть общей для всего семейства белков. Белки Nup49, Nup57, Nup100, Nup145 и Nsp1 являются наиболее распространенными белками с FG-повторами в комплексе ядерной поры дрожжей-сахаромицетов. Для каждого из этих нуклеопоринов мы отобрали не менее 170 ортологичных последовательностей из различных видов *Opisthokonta* из базы данных EggNOG. Далее эти белки были проанализированы с использованием программы ArchCandy в сочетании с инструментом IUPred для поиска неструктурированных областей, которые могут обладать амилоидными свойствами.

Затем мы выровняли белковые последовательности ортологов нуклеопоринов и оценили амилоидогенность по позициям в выравнивании, чтобы найти консервативные участки, подверженные агрегации. Такие фрагменты были обнаружены в белках Nup49, Nup57 и Nup145, а также их ортологах, но не в Nup100 и Nsp1. Для экспериментальной проверки амилоидных свойств исследуемых белков мы использовали систему C-DAG (Curli-Dependent Amyloid Generator), в которой в клетках *E.coli* продуцируются белки, образующие фибриллы на поверхности клетки. В ходе проверки склонности нуклеопоринов к агрегации в бактериальной системе C-DAG нам удалось найти три новых примера амилоидов: Nup58 *Taeniopygia guttata*, Nup98 *Drosophila melanogaster* и Nup98 *Schizosaccharomyces pombe*. Таким образом, мы предполагаем, что некоторые нуклеопорины с FG-повторами обладают консервативными амилоидными участками, что может отражать их потенциальную функциональную роль в ядерно-цитоплазматическом транспорте.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 20-34-70073.



ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭКЗОСОМАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ РАКА ЖЕЛУДКА

Денисова Д.А.

ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия

darhance@gmail.com

Экзосомы играют важную роль в жизнедеятельности многоклеточных организмов, регулируя процессы, связанные с иммунной системой, репродуктивными и другими процессами. В процессе злокачественной трансформации клетки увеличивают продукцию экзосом и меняют их молекулярный состав для создания условий, необходимых для выживания, роста, инвазии и метастазирования, а также для приобретения множественной лекарственной устойчивости. В частности, экзосомы участвуют в «перепрограммировании» клеток микроокружения, а также клеток иммунной системы для обеспечения локального роста, миграции и избегания атак со стороны системы противоопухолевого иммунитета.

На сегодняшний день не существует жестких критериев для дифференциации секретируемых клеткой частиц. Для решения этих и целого ряда других проблем (гетерогенность самих экзосом, сложности их получения без примесей сходных по размеру и плотности молекулярных комплексов, разнородность данных, получаемых с использованием разных методов выделения и анализа) создана международная организация ISEV, основной задачей которой является стандартизация исследований в данной области.

Имеющиеся данные свидетельствуют об участии экзосом в стимуляции пролиферации, миграционной и инвазивной активности клеток рака желудка, ангиогенезе и метастазировании, а также в «уходе» от иммунного надзора. Есть данные о молекулярных механизмах, посредством которых экзосомы проявляют туморогенную активность в клетках рака желудка: можно отметить активацию таких известных сигнальных путей, как PI3K/Akt-, MAPK/ERK-, TGF- β -зависимые и другие каскады. Также есть данные о связи некоторых экзосомальных белков с прогрессией рака желудка, в частности о корреляции уровня ростового фактора TGF- β с метастазированием.

Образцы забирались у пациентов РОНЦ им. Блохина методом эндоскопии. Далее материал был переведен во временные клеточные культуры для получения необходимого количества белков для анализа (измерение Bradford assay). Для установления наличия экзосом в образцах был проведен иммуноблоттинг. Результат выявил наличие в клетках рака желудка следующих белков, традиционно принятых как маркеры экзосом:

1. Стоматин,
2. Тетраспанин CD9,
3. Флотиллин,
4. TSG-101.



ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ, МОДИФИЦИРУЮЩЕЙ
G72 В мяРНК U6

**Денисова Е.Р.¹, Болихова А.К.², Марьясина С.С.³, Емельянова М.А.³,
Аверина О.А.³, Сергиев П.В.³**

¹Биологический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Факультет биоинженерии и биоинформатики, ФГБОУ ВО Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³Институт функциональной геномики, ФГБОУ ВО Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

evgeniya.denisova.1998@mail.ru

Клетки всех тканей организма образуются в результате деления одной зиготы, что определяет идентичность их генетического набора. Причиной морфологических и функциональных различий является разнообразие белков: количественное, достигающееся путем дифференциальной экспрессии генов, и качественное, возникающее в результате образования множества изоформ при альтернативном сплайсинге. Нарушение этих процессов способно стать причиной многих патологических состояний человека, что определяет особую актуальность их изучения.

мяРНК U6 входит в состав крупного сплайсосомного комплекса три-мяРНК, который связывается с 5'-концом сплайсируемого интрона. Высокая консервативность U6 и многокопийность кодирующего ее гена подтверждает решающую роль этой молекулы в ходе сплайсинга. мяРНК U6, как и другие мяРНК, подвержена множеству посттранскрипционных модификаций. Наиболее распространенной модификацией является метилирование. Метильную группу поставляют кофактор S-аденозилметионин. В качестве катализаторов выступают ферменты РНК-метилтрансферазы (РНК-МТазы).

В ходе исследований, проводимых в нашей лаборатории, была идентифицирована МТазы, метилирующая мяРНК U6 по 72 гуанину. Для выявления функциональной роли метилирования мяРНК U6 по этому положению нами проведена инактивация гена МТазы в клетках линии HeLa S3 и мышцах. Результаты высокопроизводительного секвенирования показали, что в нокаутных образцах повышена экспрессия генов-маркеров иммунного ответа и RSRP1. Мы предположили, что увеличение экспрессии генов, входящих в каскад интерферона обусловлено повышением концентрации двуцепочечной РНК, образующейся в результате нарушенного сплайсинга. Соответственно, мы предположили, что в результате этого будет возрастать активность PKR. Для проверки этой гипотезы провели сравнение концентрации фосфорилированных форм eIF2a и PKR методом Вестерн-блоттинга.

Исследование проводится при поддержке гранта РФФИ № 21-64-00006.



РОЛЬ ГЕРАНИЛГЕРАНИЛТРАНСФЕРАЗЫ I В РАЗВИТИИ МНОГОКЛЕТОЧНОГО ТАЛЛОМА *MARCHANTIA POLYMORPHA*

Джабраилова С.М., Шарипова М.Р., Валеева Л.Р.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

saidabio@icloud.com

Пренилирование является одним из важнейших типов посттрансляционной модификации белков у эукариот. Присоединение остатков фарнезила или геранилгеранила ферментами пренилтрансферазами обуславливает протекание ключевых внутриклеточных процессов, включая сигнальную трансдукцию, клеточную пролиферацию, адгезию и полярный рост, что указывает на значимость данной посттрансляционной модификации в поддержании жизнеспособности многоклеточных организмов. У растений нарушение активности пренилтрансфераз белков вызывает серьезные изменения развития и ответа на стрессовые факторы. Печеночный мох *Marchantia polymorpha* – представитель наиболее древней группы наземных растений, что позволяет использовать его как оптимальный модельный организм для исследования регуляции многоклеточности.

Целью данной работы является изучение роли пренилтрансфераз белков в развитии многоклеточного таллома печеночника *Marchantia polymorpha*.

Методом редактирования генома CRISPR/Cas9 нами были получены линии *M. polymorpha* с нокаутированным геном β -субъединицы (GGB) геранилгеранилтрансферазы I (PGGT I). Растения-нокауты сохраняли жизнеспособность и многоклеточное строение, однако не могли образовывать характерный дорсо-вентральный таллом и состояли из нетипичных округлых клеток, собранных в плотные структуры. Мы предполагаем, что данный фенотип обусловлен нарушениями в процессе пренилирования белков-мессенджеров. На основе нокаутных линий *M. polymorpha* были получены растения-комплементанты с восстановленным фенотипом растений дикого типа, экспрессирующие ген GGB, сопряженный с геном флуоресцентного белка. Таким образом, мы подтвердили, что PGGT I участвует в формировании нормального таллома растений. Также было показано, что β -субъединица PGGT I локализуется в цитоплазме клеток растений-комплементантов. Протеомный анализ растений-мутантов ΔGGB позволил выявить различия в экспрессии мембранно-связанных и цитоплазматических белков у растений дикого типа и мутантных линий. Было обнаружено, что для мутантного растения характерны белки, задействованные в процессах фотосинтеза, биосинтеза белка и ответа на стресс. Однако, в отличие от растений дикого типа, у мутантных растений отсутствуют фасцилин-подобные белки, отвечающие за регуляцию роста и развития растения, и слабо представлены сингалные белки.

Таким образом, было показано, что пренилтрансфераза PGGT I является одним из ключевых компонентов молекулярных путей, обеспечивающих нормальное формирование многоклеточного таллома растений *M. polymorpha*.

Работа выполнена в рамках проекта, поддержанного Стипендией Президента РФ СП-3391.2021.4.



ВЛИЯНИЕ ДОМЕНОВ И МУТАНТНЫХ ФОРМ БЕЛКА eIF3j ЧЕЛОВЕКА НА ЕГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ В ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

**Егорова Т.В.¹, Бизяев Н.С.¹, Шувалова Е.Ю.¹, Михалицына М.А.¹,
Шувалов А.В.¹, Алкалаева Е.З.¹**

¹ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия
tatvladegorova@gmail.com

Белок eIF3j является 13 субъединицей фактора инициации eIF3, которая очень слабо ассоциирована с 12-субъединичным коровым комплексом eIF3. В 2012 году было показано, что основной функцией дрожжевого гомолога eIF3j, HCR1, является регуляция терминации трансляции и сквозного чтения стоп-кодонов. Используя реконструированную *in vitro* систему трансляции млекопитающих, мы показали, что eIF3j человека принимает участие в терминации трансляции (Egorova T. et al. (2021) *Nucleic Acids Res* 49(19), 11181-11196), но детали механизма его функционирования в этом процессе остались невыясненными. В данной работе мы установили, как в терминации трансляции функционируют отдельные домены белка eIF3j, а также его мутантные формы. Мы получили N-концевой и C-концевой домены eIF3j, а также укороченные с N и C конца мутантные формы белка eIF3j (eIF3j_Δ1-15 и eIF3j_Δ243-258). Далее было определено влияние полученных форм eIF3j на активность факторов терминации eRF1 и eRF3a при распознавании стоп-кодонов и гидролизе пептидил-тРНК. Также в работе исследована способность доменов и мутантных форм белка eIF3j связываться с eRF3a, и влиять на его активность в гидролизе ГТФ. В экспериментах по гидролизу пептидил-тРНК мы обнаружили, что укороченный с N-конца вариант eIF3j (eIF3j_Δ1-15) полностью потерял способность стимулировать гидролиз пептидил-тРНК, а укороченный с C-конца вариант eIF3j (eIF3j_Δ243-258) на 60% менее активен, чем eIF3j дикого типа. То есть, N-концевой регион eIF3j абсолютно необходим для функционирования eIF3j в терминации трансляции, в отличие от его C-концевого региона. Таким образом, исследование активности отдельных доменов и мутантных форм eIF3j позволило нам более детально описать механизм его функционирования в терминации трансляции.

Данная работа была поддержана грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-6150.2021.1.4.

МУТАЦИИ В С-ТЕРМИНАЛЬНОЙ ЧАСТИ БЕЛКА SUP35 ВЛИЯЮТ НА СВОЙСТВА ФАКТОРА [PSI⁺] У ДРОЖЖЕЙ

Зудилова А.А., Землянко О.М., Трубицина Н.П., Бондарев С.А., Журавлева Г.А.

Кафедра генетики и биотехнологии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

aniuta.zudilova@gmail.com

Одним из наиболее хорошо изученных дрожжевых прионов является цитоплазматический фактор [PSI⁺]. Он возникает в результате агрегации Sup35, дрожжевого фактора терминации трансляции eRF3, который кодируется геном *SUP35*. В состав Sup35



входят три домена: N-концевой прионобразующий домен; заряженный средний M-домен, который участвует в поддержании $[PSI^+]$; и C-концевой жизненно-важный домен с GTP-связывающими сайтами, необходимыми для терминации трансляции. Мутации в гене *SUP35* приводят к нонсенс-супрессии, к такому же фенотипу приводит возникновение $[PSI^+]$ фактора. Известно, что мутации в N-концевом домене Sup35 влияют на появление и поддержание $[PSI^+]$. Однако было продемонстрировано, что мутации в C-концевом домене Sup35 также могут изменять свойства $[PSI^+]$. В данной работе мы изучили миссенс-мутации *sup35-228*, *sup35-10* и *sup35-25*, расположенные в GTP-связывающей области Sup35.

Мы показали, что в присутствии $[PSI^+]$ фактора не происходит замещения аллели дикого типа *SUP35* на мутантные аллели (*sup35-228*, *sup35-10*, *sup35-25*). Мы предположили, что это явление может быть вызвано неспособностью мутантного Sup35 образовывать и поддерживать прионные агрегаты. Мы индуцировали сверхэкспрессию мутантных аллелей в штамме $[psi^-]$ и оценили частоту возникновения приона. Оказалось, что мутантные аллели способны индуцировать $[PSI^+]$ фактор с частотой, сравнимой с таковой у аллели дикого типа, но значительно меньшей, чем при сверхэкспрессии только прионогенного фрагмента NM-Sup35. Другим объяснением несовместимости $[PSI^+]$ фактора с миссенс-мутациями может быть дестабилизация приона белками с аминокислотными заменами. Мы проанализировали способность миссенс-мутантных белков к агрегации *in vitro*. Было показано, что белки Sup35 способны связывать тиофлавин Т, амилоид-специфический краситель. Закономерных отличий в скорости агрегации белков Sup35 дикого типа и мутантных белков в присутствии предсуществующих агрегатов NM-Sup35 выявить не удалось. Также мы показали, что все полноразмерные Sup35 могут образовывать высокомолекулярные агрегаты. Таким образом, мутантные белки способны к агрегации как *in vivo*, так и *in vitro*. А несовместимость миссенс-мутаций *sup35* и $[PSI^+]$ может быть связана с тем, что $[PSI^+]$ секвестрирует функциональный Sup35 в агрегаты прионов, что, возможно, приводит к резкому снижению точности терминации трансляции и гибели клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 18-14-00050 и Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярно-клеточных технологий».

ПРОМОТОР ГЕНА АЛЬФА-ГАРПИНИНА *SmAMPX* ИЗ РАСТЕНИЯ МОКРИЦА (*STELLARIA MEDIA*): ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ ДВУДОЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ

Иванова Л.А., Комахин Р.А.

ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

Ivanova-Lyubov-A@yandex.ru

В данной работе исследовали промоторную область известного гена антигрибного пептида *SmAMP-X* из растения мокрица (*S. media*). Методом обратной транскрипции РНК с последующей ПЦР обнаружили мРНК гена *SmAMP-X* в листьях, стеблях, корнях и цветках мокрицы; ее уровень оказался ниже уровня мРНК гена β -актина мокрицы. Для выяснения организации растительного промотора клонировали промоторную область гена *SmAMP-X*. В геноме мокрицы обнаружили две версии промотора pro-*SmAMP-X*, нуклеотидные



последовательности которых идентичны на 83%. *In silico* анализ показал наличие нескольких десятков известных цис-действующих элементов в последовательности промотора, в т.ч. ТАТА-бокс и СААТ-бокс.

В листьях *N. benthamiana* при транзientной экспрессии репортерного гена *gus* под контролем промотора pro-SmAMP-X в составе бинарного вектора pCambia1381Z установили, что первая версия промотора слабее, а вторая сопоставима по эффективности с вирусным промотором CaMV35S. 5'-делеционный анализ показал, что удаление проксимальной промоторной области до -200 п.н. снижает промоторную эффективность pro-SmAMP-X. Аналогичные количественные результаты получили при изучении промотора pro-SmAMP-X в листьях гомозиготных линий трансгенных растений *A. thaliana*. Активность репортерного белка GUS обнаружили во всех изученных органах трансгенных растений. В трансгенных растениях *S. tuberosum* наибольшая эффективность промотора pro-SmAMP-X отмечена в проводящих тканях стебля, наименьшая в паренхиме листьев, в клубнях и в корнях.

Промотор pro-SmAMP-X оказался пригоден для экспрессии селективного гена *nptII* в составе бинарного вектора pCambia2300 при селекции трансформированных клеток, каллусов, побегов и проростков растений *N. tabacum* на питательной среде с многократным избытком антибиотика канамицина.

В целом, промотор pro-SmAMP-X может быть использован для экспрессии рекомбинантных генов в биотехнологии культурных растений.

По результатам научных исследований получен патент на изобретение № 2766095 С1 от 07.02.2022 «Промотор pro-SmAMP-X из растения звездчатка белая (*Stellaria media* L.) для экспрессии рекомбинантных генов в клетках растений» 2022 г.

Работа поддержана РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00067.

ПОИСК ПАРТНЁРОВ МЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ, ОТВЕЧАЮЩЕЙ ЗА МЕТИЛИРОВАНИЕ G72 В мяРНК U6

Иzzi А.Р.¹, Марьясина С.С.^{2,3}, Донцова О.А.^{2,3}, Сергиев П.В.^{2,3,4}, Згода В.Г.⁵

¹Институт функциональной геномики, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Факультет биоинженерии и биоинформатики, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁴ФГБНУ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия;

⁵АНОО ВПО Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия

antonizzi5@mail.ru

Одной из самых распространённых модификаций биомолекул является метилирование, которое осуществляется метилтрансферазами (МТазами). Данной модификации подвергаются ДНК, белки, малые молекулы, и в особенности РНК. Большое количество пост-



транскрипционных модификаций имеется в мРНК – молекулах РНК, принимающих активное участие в процессе сплайсинга в составе сплайсосомы. Сплайсинг – процесс, представляющий собой один из этапов процессинга мРНК, в ходе которого происходит вырезание некодирующих частей (интронов) и последующее сшивание кодирующих последовательностей (экзонов).

Настоящая работа посвящена изучению МТаза, отвечающей за метилирование нуклеотида G72 мРНК U6. В ходе поиска белковых партнёров с помощью ко-иммунопреципитации с масс-спектрометрической детекцией методом MALDI удалось выяснить, что изучаемая МТаза совыделяется с небольшим белком – TRMT112. Белок TRMT112 является ко-фактором многих эукариотических МТаз. По литературным источникам известно, что во многих случаях данный белок необходим для стабильности МТаз или правильного узнавания ими субстратов. Ряд заболеваний человека, среди которых, например, кардиомиопатии и синдром Роджерса, ассоциированы с мутациями гена TRMT112.

Совыделение изучаемой нами МТаза с TRMT112 подтвердили методом вестерн-блоттинга. Также этот белок воспроизводимо обнаруживался при анализе результатов ко-иммунопреципитации методами панорамной протеомики.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 21-64-00006.

МНОГООБРАЗНОЕ ВЛИЯНИЕ GC-ЛИГАНДА ОЛИВОМИЦИНА А НА ТРАНСКРИПЦИЮ, ОПОСРЕДОВАННУЮ РНК-ПОЛИМЕРАЗОЙ II

Исагулиева А.К.^{1,2}, Сошникова Н.В.¹, Штиль А.А.³

¹ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия;

²ФБГНУ Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков
им. Г.Ф. Гаузе, Москва, Россия;

³ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина
Минздрава России, Москва, Россия

kia2303@ya.ru

Оливомицин А (I), антибиотик группы ауреоловой кислоты (АК), образует стабильные комплексы с GC-богатыми участками в малой бороздке ДНК. Такие участки часто встречаются в регуляторных областях генов. Транскриптомные исследования показали, что антибиотики группы АК снижают экспрессию сотен генов, среди которых *c-Myc*, *c-Src*, *Hif1a*, *MDR1*; возможна и активация ряда генов [1,2]. Механизм нарушений транскрипции при действии антибиотиков группы АК неясен, как и роль молекулярного окружения отдельных генов. С помощью иммуноблоттинга, иммунопреципитации хроматина и количественной ПЦР в реальном времени нами исследовано действие I на транскрипцию эндогенов *c-Myc* и *p21* и экзогенного репортера CMV-Luc в клетках аденокарциномы толстой кишки человека (линия HCT116). Удаление GC-повторов из промотора экзогенного *Luc*-репортера приводило к тому, что I оказывался не способен связываться с промотором, и, как следствие, снижать транскрипцию и уровень RNAPII на гене. И *c-Myc*, и *p21* содержат GC-повторы в промоторной области, однако, влияние I на них не так однозначно. Соединение I (100 нМ) обратимым образом приводило к снижению представленности РНК-полимеразы II (RNAPII) на



промоторной области *c-Myc* и повышению её уровня на гене *p21*. По-видимому, хроматинизация гена-мишени имеет большее влияние на действие I, чем GC-состав промотора. Изучение взаимосвязи эпигенетического и хроматинового контекста и ингибирующего действия I актуально и необходимо для разработки более геноспецифичных и менее токсичных химиопрепаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-90064.

Литература.

1. И.Б. Чеглаков, А.Н. Тевяшова, Л.К. Курбатов и др. (2010) Нарушения транскрипции и репликации как механизмы цитотоксичности противоопухолевого антибиотика оливомицина. Доклады Академии наук. 435(4), 554-556.
2. Sleiman S., Langley B., Basso M. et al. (2011) Mithramycin Is a Gene-Selective Sp1 Inhibitor That Identifies a Biological Intersection between Cancer and Neurodegeneration. Journal of Neuroscience. 31, 6858-6870. doi:10.1523/jneurosci.0710-11.2011

НОВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ 6S РНК БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Карпов А.С.¹, Елкина Д.А.², Григоров А.С.³, Ажикина Т.Л.³, Кубарева Е.А.²

¹Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

aluchance@gmail.com

6S РНК является малой некодирующей РНК, впервые обнаруженной в γ -протеобактерии *Escherichia coli*. Для *E. coli* было показано, что 6S РНК участвует в регуляции экспрессии большого количества генов, связываясь с холоферментом σ^{70} -РНКП. Однако 6S РНК других бактерий к настоящему моменту изучена мало. Позже подобные молекулы были найдены и в других представителях прокариот, включая *Rhodobacter sphaeroides* из семейства α -протеобактерий. Пурпурная бактерия *R. sphaeroides* интересна своей способностью приспосабливаться к различным условиям окружающей среды. Для этого, несомненно, нужен гибкий профиль экспрессии генов, и 6S РНК может играть в этом ключевую роль.

Цель данной работы – выяснение функциональной роли 6S РНК бактерии *R. sphaeroides*.

В ходе работы использовали штамм дикого типа *R. sphaeroides* и созданный на его основе нокаутный штамм с делецией гена 6S РНК (Δ *ssrS*). В обычных условиях культивирования различий в ростовых фенотипах нокаутного и исходного штаммов не обнаружили. На первом этапе исследования был выполнен транскриптомный анализ указанных штаммов методом РНК-секвенирования. Для этого общую РНК выделяли



реагентом Trizol из клеток, отобранных в экспоненциальной и ранней стационарной фазах роста. Далее образцы, очищенные от ДНК и рРНК, использовали для подготовки библиотек кДНК, которые секвенировали на платформе Illumina. Качество полученных данных анализировали в программе FastQC, затем прочтения картировали на референсный геном *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Подсчёт картированных прочтений выполняли программой FeatureCounts, поиск дифференциально экспрессированных генов – программой DESeq2. Мы установили, что в экспоненциальной фазе роста в клетках $\Delta ssrS$ по сравнению с диким типом примерно в 1,5 раза изменяется количество мРНК 13 генов с $p\text{-adj} < 0.1$. Методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией мы подтвердили этот результат для восьми генов. Среди них гены, кодирующие белки, ответственные за синтез аспарагина, цистеина, гомоцитриновой кислоты, окисление сложных жирных кислот, метилирование и т.д.

В ходе исследования мы выдвинули предположение, что, вероятно, 6S РНК играет более важную роль в выживаемости бактерии в стрессовых условиях ввиду относительно небольших изменений в уровнях транскрипции найденных генов в обычных условиях роста. Для проверки этой гипотезы построили кривые роста *R. sphaeroides* в различных стрессовых условиях. Обнаружено, что при содержании в среде 250 мМ NaCl штамм $\Delta ssrS$ растёт в 1,2 раз медленнее, чем исходный штамм *R. sphaeroides*, а при добавлении KCl до той же концентрации – в 1,4 раз медленнее. Предположительно эти результаты можно объяснить близким расположением гена *ssrS* к гену *sspA*, кодирующему белок, который отвечает за выживаемость *R. sphaeroides* при солевом стрессе. Добавление в культуральную среду сорбитола в различных концентрациях и повышение температуры инкубации с 32°C до 42°C не привели к значимой разнице в росте между клетками мутантного и исходного штаммов.

Таким образом, мы впервые выявили ряд генов *R. sphaeroides*, в регуляции транскрипции которых участвует 6S РНК, а также показали её влияние на рост клеток в условиях солевого стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 19-04-00791.

УТОЧНЕНИЕ СТРУКТУРЫ КЛТ-ДНК *IPOMOEA BATATAS* (L.) LAM.

Киселев М.О.¹, Владимиров И.А.², Павлова О.А.², Богомаз Д.И.^{3,2}

¹АНОО «Гатчинская гимназия «Апекс» среднего общего образования, Гатчина, Россия;

²ООО «Бигль», Санкт-Петербург, Россия;

³ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

2386944@gmail.com

В природе существуют примеры закрепления генетических последовательностей *Agrobacterium sp.* в растительных геномах.

Батат (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) – растение из семейства *Convolvulaceae*. Геном культивируемого батата содержит последовательности, получившие название *IbT-DNA1* и *IbT-DNA2*. Они гомологичны участкам переносимой Т-ДНК агробактерий.



Последовательность *IbT-DNA2* (KM052617) была взята из открытой базы данных NCBI. Её анализ *in-silico* осуществлялся с помощью программного обеспечения Vector NTI. В результате было выяснено, что в ней существует регион, последовательность после которого является инвертированной копией предшествующей ему последовательности («точка перелома»). Так как на концах этого региона в источнике были отмечены ORF, это дало основания сомневаться в валидности аннотирования этих генов для этой части вставки.

Для исследования были выбраны экземпляры 8 сортов батата, для генома каждого из которых методом RT-PCR проверялось наличие или отсутствие бактериальных вставок. Наличие *IbT-DNA1* показано для всех образцов, *IbT-DNA2* – только для сорта «Победа 100». Далее проводились ПЦР с набором длинных праймеров, позволяющие на основании размеров ампликонов сделать выводы о структуре *IbT-DNA2*. Значительный выход продукта показали лишь две из шести систем. Первая подтвердила наличие в образце «точки перелома», а вторая – другого укороченного участка вставки.

Таким образом, нами показано, что геном культивара *Ipomoea batatas* «Победа 100» содержит в себе 2 вида генетических вставок бактериального происхождения. При сборке последовательности KM052617, вероятно, были допущены значительные ошибки.

БЛОЧНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬЮ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Киссер М.-С.М., Глазко В.И.

ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет
– МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

arahna1984@mail.ru

Процесс доместикиции неразрывно связан с функциональными изменениями высшей нервной деятельности. Известно, что блок из 25-28 генов на хромосоме 7, испытывающий гемиделения/гемидупликации при синдроме Вильямса-Берена, связан с социальными изменениями, не только у человека, но и у собак [1]. Среди данных генов выделяется фактор регуляции транскрипции *baz1b*, экспрессия которого достоверно коррелирует с экспрессией 448 генов.

Для выяснения взаимосвязи между генами области синдрома Вильямса-Берена (7q11.23 у человека) в настоящем исследовании выполнен поиск генов, контролируемых *baz1b*, с использованием программы для построения генных сетей STRING. Оказалось, что один из таких генов *ammecr1* находится в тесном генетическом сцеплении с 14-ю плацентарными генами, входящими в кластер *Vex/Tseal*, локализованных в хромосоме X. Возникновение семейства генов *Vex*, кодирующих рецептор фактора роста нейронов, обусловлено путем рекомбинации плацентарных ретротранспозонов *HAL1b*, *L1ME-like*. Контролируемый *baz1b* ген *erbb4*, входящий в сигнальные пути нейрегулин-ErbB, образует очень консервативную для многих млекопитающих группу сцепления с геном *cul3* и участвует в сигнальных путях MAPK. Пути MAPK и Wnt взаимодействуют с передачей сигналов *Sema3A*, который играет роль в наведении аксонов в развивающейся нервной системе. В генную сеть *Sema3A* входят *plxna4* и *limk1*, располагающиеся на хромосоме 7. За регуляцию



роста аксонов отвечает ген *olfm1*, находящийся на хромосоме 8 и участвующий в сигнальном пути Wnt. Ответственные за развитие нервного гребня гены *snai2* и *nolc1* сцеплены и располагаются на хромосоме 10. Ген *baz1b* не имеет прямого воздействия на нервную систему, однако его продукт и связанные с ним гены воздействуют на прилежащее ядро и формируют адаптивные ответы на хронический стресс, связанный с социальной неуспешностью.

Можно ожидать, что основой нарушения социального поведения являются гены, экспрессию которых контролирует *baz1b*, так как они участвуют в большем количестве метаболических путей, вовлеченных в разные этапы развития нервной системы, включая процессы формирования мотивации и обучения. Другие гены локуса 7q11.23 характеризуются существенно меньшим количеством метаболических путей с их участием.

Литература.

1. Wilkins A.S. Revisiting two hypotheses on the “domestication syndrome” in light of genomic data.
2. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii= Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(4):435-442.

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ К АГРЕГАЦИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА

**Козлова А.В.¹, Зелинский А.А.¹, Рябинина М.В.¹, Солодухина У.Н.¹, Рубель А.А.^{1,2},
Бондарев С.А.^{1,2}, Чернов Ю.О.³**

¹Лаборатория биологии амилоидов, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²Кафедра генетики и биотехнологии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³Школа биологических наук, Технологический институт Джорджии, Атланта, США

av.kozlova.99@gmail.com

Отложение амилоидов является ключевым событием в патогенезе ряда заболеваний человека и животных, называемых амилоидозами. Наиболее известными амилоидозами являются болезни Альцгеймера и Паркинсона, хорея Хантингтона, диабет II типа. Кроме патогенных амилоидов известны и функциональные, участвующие в важных биологических процессах [1]. Предполагается, что амилоидов и амилоидогенных белков значительно больше, чем известно на данный момент.

В ходе данной работы проведена оценка способности к амилоидной агрегации трансмембранных белков человека, отобранных по результатам предсказания при помощи алгоритма ArchCandy [2]. Ранее оценка способности трансмембранных белков человека к агрегации не проводилась.

Используя алгоритм ArchCandy, мы проанализировали 5193 трансмембранных белка. Пороговое значение суммарного счета для поиска кандидатов соответствовало 0,575. Последовательности, для которых показатель превышал пороговое значение, рассматривались как амилоидогенные. Для 95% проанализированных в работе трансмембранных белков, алгоритм ArchCandy предсказывал склонность к формированию β -арок. По результатам анализа *in silico*, были отобраны 4 белка с разными значениями суммарного счета: VT11B (счет



= 42005), STX7 (счет = 25447), TMX1 (счет = 22859) и SCAMP5 (счет = 31,94). Для проверки амилоидогенного потенциала данных белков *in vivo* была использована дрожжевая модель. Было установлено, что все исследуемые белки при слиянии с последовательностью YFP, формируют в дрожжах флуоресцентные агрегаты. Также была проведена оценка амилоидогенного потенциала исследуемых белков в разработанной нами ранее дрожжевой тест-системе фенотипической детекции агрегации белков [3, 4].

В дальнейшем планируется провести оценку устойчивости агрегатов, формируемых трансмембранными белками к ионным детергентам, а также исследовать амилоидные свойства белков *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-14-0014, а также Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 93025998).

Литература.

1. Rubel, Maria S et al. “Functional Mammalian Amyloids and Amyloid-Like Proteins.” *Life* (Basel, Switzerland) vol. 10,9 156. 21 Aug. 2020.
2. Ahmed A.B. et al., A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis. *Alzheimer’s & Dementia* V. 11(6), 2015, P. 681–690.
3. Chandramowliswaran P. et al., Mammalian amyloidogenic proteins promote prion nucleation in yeast. *J. Biol. Chem.* V. 293(9), 2018, P. 3436-3450.
4. Chernoff et al., Application of yeast to studying amyloid and prion diseases. *Advances In Genetics* V. 105(7), 2020, P. 308-314.

ВЛИЯНИЕ СОКУЛЬТИВАЦИИ С МОНОЦИТАМИ НА СИСТЕМУ ПРОТЕОСТАЗА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Кокорева Н.Е., Владимирова С.А., Никотина А.Д., Маргулис Б.А., Гужова И.В.

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

kokoreva.nadya00@gmail.com

Введение. Различные факторы, выделяемые в микроокружение, запускают в раковых клетках защитные механизмы, благодаря которым может снижаться чувствительность клеток к химиотерапевтическим препаратам. К основным защитным механизмам клетки относится система белков-шаперонов. Показано, что во многих опухолях шапероны синтезируются на высоком уровне, что позволяет им эффективно противостоять апоптотическим стимулам в ходе применения препаратов первой линии химиотерапии. Синтез шаперонов осуществляется благодаря транскрипционному фактору HSF1.

Цель работы. Изучить влияние опухолевого микроокружения на приобретение резистентности раковыми клетками через шаперонный аппарат клетки и главный транскрипционный фактор белков теплового шока – HSF1.

Материалы и методы. В качестве клеточных моделей были выбраны линии клеток HCC6, HCC7 HCC9, полученные из опухолей пациентов с колоректальным раком, линии клеток A549 и HCT15. В качестве модели иммунного опухолевого микроокружения



использовали клеточную культуру моноцитов THP1. В ходе экспериментов опухолевые клетки сокультивировали с моноцитами в течение 20 часов. На приборе xCELLigence, а также методами проточной цитометрии, мы исследовали пролиферацию и клеточную гибель опухолевых клеток под действием цитотоксических препаратов. Люциферазный репортерный тест позволил оценить степень транскрипционной активности HSF1. Методы конфокальной микроскопии и вестерн-блоттинга использовали для оценки изменения уровня белка HSF1 и его активной формы pHSF1(Ser326).

Результаты проточной цитометрии показали, что сокультивация клеток A549 с моноцитами THP1 приводит к их устойчивости против препарата эпозида. На приборе xCELLigence мы продемонстрировали, что инкубация клеток колоректального рака пациентов HCC6, HCC7, HCC9 с THP1 задерживает их под действием хлорокина. Результаты иммуноблоттинга показали, что для клеточных линий HCC6, HCC7 и HCC9 характерно повышение уровня pHSF1 (Ser326), тотального HSF1 и HSP70 после сокультивации с THP1. С помощью метода конфокальной микроскопии мы продемонстрировали, что помимо увеличения pHSF1(Ser326) в клетках происходит изменение ее локализации на ядерную, что свидетельствует об активности HSF1 как транскрипционного фактора.

Выводы. В результате сокультивации с моноцитами THP1 клетки различных опухолей приобретают резистентность к химиотерапевтическим препаратам, что может быть следствием активации HSF1 и системы шаперонов.

Работа выполнена при поддержке РФФ № 19-74-20161.

РЕТРОТРАНСПОЗОНЫ SABRINA В «ГЕНОФОНДНОМ СТАНДАРТЕ» ПОРОД КРОЛИКОВ

Колесник Е.С.

ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства
им. В.А. Афанасьева, пос. Родники, Россия

elena.rainis.lis@yandex.ru

Важнейшей задачей в настоящее время признана необходимость сохранения и совершенствования породного разнообразия сельскохозяйственных видов животных. Очевидна необходимость создания новых методов, позволяющих проводить сравнение их геномов без полногеномного секвенирования. Одним из таких подходов является выбор наиболее полиморфных геномных элементов. Известно, что почти половина генома млекопитающих состоит из диспергированных повторов, в основном, представленных ретротранспозонами. Ретротранспозоны Sabrina впервые обнаружены в геноме ячменя (*Hordeum vulgare*), изучение которых выявило увеличение генома растения новыми вставками ретротранспозонов.

В настоящем исследовании рассмотрен полиморфизм геномных участков гомологичных фрагментам длинных концевых повторов 3 ретротранспозонов (Sabrina 111, Sabrina 1336 и Sabrina), у трех пород кроликов (советская шиншилла, калифорнийская и белый великан), а также, полученном на их основе, трехпородном кроссе «Родник». На основании



оценок полиморфизма суммарно 23 локуса, 5 из которых являются консервативными, а 18 полиморфными.

Анализ фореграмм выполнен на основе расчета доли полиморфных локусов, полиморфного информационного содержания (PIC), эффективного мультиплексного отношения (EMR) и маркерного индекса (MI). PIC рассчитывался по формуле: $PIC = 2f(1-f)$, где f – частота одного из двух аллелей. $EMR = np(np/n)$, где np – число полиморфных локусов, n – общее число локусов. Расчет маркерного индекса: $MI = PIC \times EMR$.

Наивысший полиморфизм ($PIC = 0,382$ и $0,386$ соответственно) и показатели EMR (3,125 и 6,125) и MI (1,194 и 0,063) у синтетического кросса Родник, из представленных молекулярно-генетических маркеров, был обнаружен в спектрах праймеров Sabrina 111 и Sabrina.

На референтном геноме OryCup 2.0 в системе BlastN по поиску гомологии к нуклеотидной последовательности исследуемого праймера Sabrina111 выявлено преимущественное количество участков гомологии в нуклеотидной последовательности рецептора тиреотропного гормона (20 хромосома), нейроглина 1 (16 хромосома) и в предшественнике пролактина (12 хромосома у которого встречается несколько десятков раз участки гомологии к этому праймеру с не менее 80% сходства).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что транспозон Sabrina111 можно применять для «генофондного стандарта» синтетического кросса и направленной селекции на основе высоких показателей полиморфизма ($PIC = 0.382$, ДПЛ = 62,5%), а анализ референтного генома указывает на расположение этого маркера в генах, по которым, возможно, проходил отбор, позволяющий консолидировать кросс от базовых пород.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ EIF4E *SOLANUM TUBEROSUM*

Колесникова В.В.^{1,2}, Никонова Е.Ю.¹

¹ФГБУН Институт белка РАН, Пушчино, Россия;

²ФГБУ ВО Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пушчино, Россия

katya_nik@vega.protres.ru

Картофель (*Solanum tuberosum*) в мире занимает четвертое место среди наиболее важных сельскохозяйственных культур после пшеницы, кукурузы и риса. Большинство сортов *S. tuberosum* являются тетраплоидами ($4n=48$). Как вегетативно размножаемая культура, вопрос борьбы с вирусами для картофеля наиболее актуален. Одним из наиболее активно изучаемых факторов восприимчивости культуры к вирусам, использующим кэп-зависимый механизм инициации трансляции, является эукариотический фактор инициации трансляции 4E (eIF4E). Он связывает кэп при инициации трансляции и в картофеле представлен семейством белков: eIF4E1, eIF4E2 и eIF(iso)4E, структурная информация о которых на данный момент отсутствует.

Для определения структуры факторов eIF4E картофеля необходимо получить их в препаративных количествах с чистотой, пригодной для кристаллизации. Целью работы является разработка методики выделения белков eIF4E1 и eIF4E2. В качестве основы для



создания экспрессионного вектора служила плаزمида *ret32*, несущая селективный ген ампициллин (Amp). Для аффинной очистки целевой белок на N-конце содержит 6His. Полученными векторами трансформировали *E. coli* штамма BL 21 DE3/Rosetta, особенностью которого является наличие плазмиды, кодирующей шесть тРНК, соответствующих редким для *E. coli* кодонам. Чтобы белок не накапливался в тельцах включения индукцию синтеза белка проводили при пониженной температуре (20 °C) в течение 20 часов. Нами были найдены оптимальные условия разрушения клеток и подобрана последовательность хроматографических очисток. Скрининг фракций, содержащих целевые белки проводили с помощью ПААГ электрофореза в присутствии ДСН. По разработанной методике нами были выделены как полноразмерные eIF4E1 и eIF4E2, так и варианты с усеченными неструктурированными частями (eIF4E1-49aa и eIF4E2-39aa).

Достигнутый результат позволяет использовать разработанные методики для получения eIF4E1 и eIF4E2 в препаративных количествах.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ И ТЕСТИРОВАНИЯ АКТИВНОСТИ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗЫ MUTYH МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Кручинин А.А.¹, Шилкин Е.С.¹, Жарков Д.О.^{2,3}, Макарова А.В.¹

¹ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

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

³ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный
университет, Новосибирск, Россия

kruchinin77@gmail.com

ДНК-гликозилаза MUTYH, гомолог MutY у млекопитающих, является одним из ключевых ферментов эксцизионной репарации оснований (ЭРО). MUTYH обеспечивает репарацию аденина, включенного напротив матричного 8-оксогуанина (8-охо-G) – мутагенного повреждения, возникающего в ходе окислительного повреждения ДНК. После гидролиза гликозидной связи между основанием аденина и дезоксирибозой образуется апуриновый/апириимидиновый сайт. Последующий каскад реакций MUTYH-опосредованной ЭРО ведёт к замене некомплементарного дезоксиаденозинмонофосфата на дезоксицитидинмонофосфат, предупреждая трансверсии G:C→T:A и снижая мутагенный потенциал 8-охо-G. ДНК-полимеразы, участвующие в транслезионном синтезе напротив 8-охо-G, точно не определены. Мутации и полиморфизмы в гене MUTYH ассоциированы с наследуемым аутосомно-рецессивным MUTYH-ассоциированным полипозом. Выделение MUTYH человека представляет большие сложности. Был разработан метод выделения и очистки фермента мыши mMUTYH, схожего по структуре и функциям с белком человека. Рекомбинатный mMUTYH был выделен из 10 литров культуры *E. coli*. Трехстадийная очистка mMUTYH с 8xHis тагом производилась с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе, гепарин-сефарозе и SP-сефарозе. Тестирование ДНК-гликозилазной активности MUTYH проводили на олигонуклеотидных ДНК-дуплексах, меченных с 5'-конца радиоактивным ³²P. Показано, что mMUTYH проявляет активность по отщеплению аденина на матрицах, содержащих A:G и A:8-охо-G, а АП-эндонуклеаза человека



APЕ1 расщепляет АП-сайт, созданный mMUTУН. Добавление APЕ1 в реакцию не оказывает существенного влияния на специфичность активности mMUTУН по отношению к паре А:8-охо-С. Добавление в реакцию транслезионных ДНК-полимераз человека Pol λ и Pol ι без добавления других репликативных факторов не оказало существенного влияния на ДНК-гликозилазную активность mMUTУН. Однако, Pol β подавляла ДНК-гликозилазную активность MUTУН на субстрате с парой А:С, но не А:8-охо-С, повышая специфичность распознавания гликозилазой MUTУН 8-охо-С.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (№ 20-04-00554-а) и РФФ (№ 22-24-20156).

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА CHD1 НА ЭКСПРЕССИЮ ДЛИННЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК ROX1 И ROX2

Кучинская Я.А.¹, Репинская Ж.А.², Конев А.Ю.¹

¹ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ
«Курчатовский институт», Гатчина, Россия;

²ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

kuchinskaya_yaa@pnpi.nrcki.ru

Процесс дозовой компенсации (ДК) у дрозофилы может выступать в качестве модели для изучения координированных изменений транскрипции на уровне отдельных хромосом и вовлеченных в этот процесс факторов, благодаря работе которых происходит двукратное увеличение экспрессии X-хромосомных генов у самцов. Комплекс дозовой компенсации (КДК) (MSL: male-specific lethal) играет центральную роль в этом процессе. В состав комплекса входят белки MSL1-MSL3, ацетилтрансфераза MOF, РНК геликаза MLE и две длинные некодирующие РНК (roX1 и roX2). Наша работа направлена на выявление возможной функции консервативного хроматин-ремоделирующего фактора CHD1 (chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1) в процессе ДК у *D. melanogaster* с помощью анализа влияния этого фактора на изменение уровней экспрессии некодирующих РНК roX1 и roX2. Предпосылкой для исследования послужил факт сильной деформации X-хромосомы у самцов дрозофилы на фоне мутации гена *Chd1*, а также связывание белка CHD1 материнского происхождения у таких особей исключительно с X-хромосомой.

Оценка уровней экспрессии некодирующих РНК roX1 и roX2 у самцов нуль-мутантов и дикого типа проводилось методом ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР) с использованием в качестве референса гена RpL32. В качестве материала нами использовались слюнные железы, личинки третьего возраста и головы 4-х и 10-дневных имаго. Обработка результатов производилась с помощью программы REST 2009, при этом нормализация велась по референсному гену и по соответствующим значениям дикого типа.

Нами были показаны ткане- и стадийспецифические изменения уровней экспрессии длинных некодирующих РНК roX1 и roX2 в образцах мутантных самцов относительно дикого типа. Так в слюнных железах экспрессия roX2 достоверно увеличена в среднем в 1,5 раза, тогда как уровень экспрессии roX1 существенно не меняется. При этом для целых личинок 3-го возраста наблюдается увеличение уровня экспрессии roX1 в среднем в 3,1 раза, а экспрессия



гоX2 увеличивается примерно в той же степени, как и в слюнных железах. В случае образцов, полученных из голов 4-х и 10-дневных имаго, детектируется наибольшее влияние нуль-мутации по гену *Chd1*: так экспрессия гоX1 увеличена в 3,9 и 3,4 раза соответственно, а экспрессия гоX2 достоверно снижается с возрастом по сравнению с контрольными особями.

Полученные данные свидетельствуют о специфическом вовлечении *Chd1* в регуляцию длинных некодирующих РНК гоX1 и гоX2 в ходе развития у *D. Melanogaster*.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-00864.

ОТБОР АНТИСЕНС ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ТОКСИЧНЫХ ДЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА

**Лаушкина В.О.¹, Смирнов В.В.¹, Васильева Т.В.¹, Дрозд В.С.¹,
Недорезова Д.Д.¹, Колпащиков Д.М.²**

¹ФГАОУ ВО Национальный исследовательский институт ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

²Университет центральной Флориды, Орlando, США

lera_laushkina@mail.ru

Антисенс терапия – относительно новое направление генной терапии. Сейчас активно ведется разработка антисенс препаратов, направленных на лечение раковых опухолей [1].

Существует несколько механизмов действия антисенс олигонуклеотидов, направленных на подавление экспрессии генов. В настоящем исследовании используется механизм расщепления мРНК таргетного гена ферментом РНказой H в антисенс-ДНК/мРНК дуплексе [2].

Целью исследования является поиск эссенциальных генов, антисенс нокдаун которых будет вызывать окислительный стресс и гибель большинства клеток в нескольких клеточных линиях. Подобранный антисенс будет взят за основу для селективной ДНК-наномашины, которая будет активироваться только в присутствии ракового маркера [3].

Поиск потенциальных таргетных генов производился с использованием литературы и баз данных, содержащих информацию об эссенциальности генов, Depmap portal, OGEE, HumanCyc. Всего было подобрано 12 генов-мишеней: WEE1, TOP2A, NCO2A, PLK1, RUNX1, POLR2A, RAN, RPL13, RPL18, POLR2F, PSMC3.

Антисенс олигонуклеотиды были сгенерированы с помощью биоинформатической программы PFRED 1.0 [4]. Все нуклеотиды были химически модифицированы фосфотиоатной защитой от нуклеазной дегградации внутри клеток.

Для исследования были выбраны три опухолевые линии человека K562, SKOV-3, HCT-116. 50 000 клеток трансфицировали липосомами, содержащими 500 нМ антисенсов и помещались в инкубатор на 24 часа.

Оценка цитотоксичности, окислительного стресса, производилась методом проточной цитометрии. Перед анализом клетки были инкубированы с красителем MitoTracker Red в течение 30 минут, затем отмыты от среды в PBS. Снятие результатов производилось в канале APC.



В результате наибольшую цитотоксичность одновременно во всех трех линиях показали антисенсы на гены RPL13 и PSMC3. Жизнедеятельность клеток подавлялась на 40-70%, окислительный стресс повышался на 21-28% (в зависимости от клеточной линии).

Литература.

1. Farooqi A.A., ur Rehman Z., Muntane J. Antisense therapeutics in oncology: current status //OncoTargets and therapy. – 2014. – Т. 7. – С. 2035.
2. Dhuri K. et al. Antisense oligonucleotides: an emerging area in drug discovery and development //Journal of clinical medicine. – 2020. – Т. 9. – №. 6. – С. 2004.
3. Nedorezova D.D. et al. Deoxyribozyme-Based DNA Machines for Cancer Therapy //ChemBioChem. – 2020. – Т. 21. – №. 5. – С. 607-611.
4. Sciabola S. et al. PFRED: A computational platform for siRNA and antisense oligonucleotides design //PloS one. – 2021. – Т. 16. – №. 1. – С. e0238753.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЕКРЕТОМОВ ШЕСТИ ТИПОВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Лобов А.А.¹, Хижина А.А.¹, Клаузен П.Е.¹, Котова А.В.¹, Зайнуллина Б.Р.²,
Енукашвили Н.И.¹, Малашичева А.Б.¹**

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

arseniylobov@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) имеют широкий терапевтический потенциал, который, прежде всего, связан с их биологически активным секретомом. Известно, что секретом МСК может способствовать регенерации тканей, снижать воспалительные реакции, индуцировать пролиферацию клеток и т.п. Более того, уже проводятся десятки клинических исследований по использованию секретомов МСК в терапии.

Состав и терапевтические свойства секретомов различаются в зависимости от источника для выделения и условий культивирования МСК. Тем не менее, существует лишь несколько работ по сравнительному анализу секретомов МСК из разных тканевых источников в одних условиях культивирования. На это накладываются и различные способы модификации секретомом МСК при помощи различных воздействий, например культивирования в условиях гипоксии. Перспективным представляется использование секретомом МСК на различных стадиях дифференцировки, однако, как и в случае сравнения разных типов МСК, в литературе нет систематических сравнений изменения состава секретомом различных МСК под действием дифференцировочных стимулов.

В рамках данной работы мы провели описание секретомом шести типов МСК в стандартных условиях культивирования и после индукции остеогенной дифференцировки. Для этого использовали первичные культуры МСК жировой ткани, МСК пульпы зуба, МСК связки зуба, МСК желе Уортона, остеобластов и гингивальных фибробластов. Для получения секретомом клетки культивировали в среде без сыворотки в течение 48 часов с последующим



выделением белка из кондиционированной среды и его скорострельным протеомным анализом.

На кластеризации по полученным протеомным данным, можно выделить четыре кластера, соответствующих (1) остеобластам, (2) МСК жировой ткани, (3) МСК желе Уортона и (4) мезенхимным клеткам зуба (МСК пульпы и связки зуба и гингивальные фибробласты). В ходе остеогенной дифференцировки состав секрета всех изученных клеток претерпевает значительные изменения, однако они сохраняют этот же паттерн кластеризации, что свидетельствует о тканеспецифичности секретомов МСК. Эта тканеспецифичность сохраняется и после дифференцировки.

Таким образом, мы описали разнообразие секретомов первичных культур МСК, что открывает возможности для подбора секрета с оптимальными биологическими свойствами для решения конкретных биомедицинских задач.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ номер 19-29-04082.

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМА ВЫРАБОТКИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К СПАРСОМИЦИНУ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТКАХ

Логунов С.Е.^{1,2}, Марьясина С.С.¹, Донцова О.А.¹, Сергиев П.В.¹

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева
stepa.2003@bk.ru

Спарсомицин – антибиотик бактериального происхождения, имеющий широкое применение как в медицине, так и в биотехнологии. Механизм его действия изучается очень активно, но до конца все подробности до сих пор не известны. Так, установлено, что основным местом связывания антибиотика с рибосомой является А-сайт пептидил-трансферазного центра [1]. Установлено, что спарсомицин связывается с А-сайтом пептидил-трансферазного центра и его связывание приводит к «замораживанию» пептидил-тРНК в Р-сайте. Спарсомицин способен ингибировать рост не только эукариотических клеток, но также и архей. Несколько работ по изучению возникновения устойчивости клеток к спарсомицину было выполнено на археях. Так, именно на археях было показано, что одним из вариантов возникновения устойчивости к спарсомицину является выключение метилирования одной из позиций в рРНК [2]. Также есть данные о том, что некоторые мутации в рРНК приводят к возникновению устойчивости к этому антибиотику [3].

В настоящей работе проведен эксперимент по идентификации других вариантов возникновения резистентности эукариотических клеток к спарсомицину. Для этого проведен CRISPR-скрининг на клетках линии Nap1. С помощью библиотеки лентивирусов Brunello [4], содержащей уникальные гидовые РНК, нацеленные на 19114 человеческих генов, получена библиотека нокаутов Nap1, содержащая клетки, несущие не менее 22523 различных гидовых РНК. Отбор на спарсомицине позволил вывести устойчивые к нему линии клеток. Методами высокопроизводительного секвенирования установлено, что среди отобранных клеток преобладают те, в которых имеются гидовые РНК, нацеленные на гены, отвечающие за



регуляцию транскрипции. Среди наиболее представленных хитов обнаружены гены ASH2L, DPY30 и HMX3, участвующие в образовании MLL1/MLL-комплекса, необходимого для метилирования лизина-4 в гистоне H3 и ген SMARCA4, отвечающий за регуляцию экспрессии путём ремоделирования хроматина.

Таким образом, можно заключить, что в приобретении устойчивости эукариотических клеток к спарсомицину немаловажную роль играет регуляция экспрессии генов. Точный механизм проявления этого влияния предстоит выяснить в ходе дальнейшей работы.

Работа выполнена при поддержке РФФИ 20-04-00736.

Литература.

1. Moazed at al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.9 (1991): 3725-3728.
2. Lazaro et al. *J. Mol. Biol* 264 (1996): 839.
3. Tan at al. *Journal of molecular biology* 261.2 (1996): 222-230.
4. Sanson et al. *Nat Commun* 9: 5416. (2018).

ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА DNMT3A СВЯЗЫВАЕТСЯ С G4-КВАДРУПЛЕКСАМИ ЗА СЧЕТ ЕЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДОМЕНА

Лойко А.Г., Сергеев А.В., Генатуллина А.И., Громова Е.С.

Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

andrewloykochem@gmail.com

У млекопитающих метилирование цитозинового остатка в CpG-сайтах ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазой (МТазой) Dnmt3a. Промоторные участки онкогенов, в отличие от соответствующих участков активно транскрибируемых генов, обычно метилированы. В промоторных областях онкогенов находят G-квадруплексные структуры. Как будет функционировать МТазы Dnmt3a при наличии такого отклонения структуры ДНК от классической B-формы, неизвестно. Целью работы явилось изучение одного из этапов реакции метилирования – возможности образования комплексов МТазы Dnmt3a мыши и ее отдельных доменов с олигонуклеотидом, содержащим фрагмент (GGGT)₄, который образует внутримолекулярный параллельный G-квадруплекс.

Исследовано взаимодействие флуоресцентно меченного олигонуклеотида FAM-(GGGT)₄ с полноразмерной МТазой Dnmt3a2, а также с ее каталитическим (Dnmt3a-CD) и регуляторным (PWWP) доменами. PWWP-домен отвечает за взаимодействие Dnmt3a с нуклеосомой за счет узнавания хвоста гистона H3, триметилированного по 36-ому остатку лизина. Рекомбинантные Dnmt3a2, Dnmt3a-CD и PWWP-домен выделены из клеток штамма *E. coli*, трансформированных плазмидами, несущими соответствующие гены.

Методом поляризации флуоресценции установлено, что FAM-(GGGT)₄ образует комплексы с Dnmt3a2 и с каждым из ее доменов. При этом Dnmt3a-CD формирует более прочный комплекс с FAM-(GGGT)₄, чем PWWP-домен (K_d 120 ± 50 нМ и 950 ± 140 нМ, соответственно). Комплекс Dnmt3a-CD с FAM-(GGGT)₄ сравним по прочности с комплексом



Dnmt3a-CD и канонической ДНК (K_d 70 ± 20 нМ) и превосходит комплекс Dnmt3a-CD с олигонуклеотидом без G4 (K_d 210 ± 10 нМ). Полученные результаты качественно подтверждены методом торможения в геле.

Таким образом, G-квадруплекс в составе ДНК взаимодействует с МТазой Dnmt3a преимущественно за счет каталитического домена фермента. Этот факт позволяет предположить, во-первых, возможное изменение активности фермента из-за его секвестирования на неканонической структуре. Во-вторых, изменение взаимодействия РWWP с хвостом гистона и с нуклеосомой маловероятно (не будет конкуренции за связывание). Интересно, что прокариотическая МТаза M.SssI, имеющая десять общих ключевых мотивов с Dnmt3a-CD, связывает FAM-(GGGT)₄ значительно хуже (K_d 490 ± 100 нМ). По-видимому, это связано со способностью Dnmt3a-CD к тетрамеризации, сопровождающейся образованием ДНК-связывающих поверхностей, более специфичных к G-квадруплексным структурам, чем мономерная M.SssI.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-0036.

РОЛЬ КОНСЕРВАТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ КАТАЛИТИЧЕСКОГО СУБДОМЕНА MODC В ДНК-ПОЛИМЕРАЗНОЙ И ПРАЙМАЗНОЙ АКТИВНОСТЯХ PRIMPOL ЧЕЛОВЕКА

Манукян А.А., Макарова А.В., Болдинова Е.О.

ФГБУ Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

annamg183@gmail.com

PrimPol человека – праймаза/полимераза суперсемейства археозукариотических праймаз (АЭП), впервые выделенная в 2013 году. Она обладает активностями ДНК-/РНК-праймазы и специализированной ДНК-полимеразы. PrimPol играет существенную роль в репликации геномной и митохондриальной ДНК, предотвращая остановки репликативной вилки, вызванные различными повреждениями. Благодаря праймазной активности PrimPol инициирует синтез ДНК *de novo* после объемных повреждений. Кроме того, PrimPol может встраивать нуклеотиды напротив необъемных повреждений ДНК, или отжигать праймер ниже поврежденного участка ДНК.

Механизм работы PrimPol мало изучен. Биохимические исследования отдельных аминокислотных остатков активного центра позволяют получить важную информацию о свойствах PrimPol. В настоящей работе исследовали варианты PrimPol с заменами консервативных аминокислотных остатков субдомена ModC – Asn289 и Arg288, контактирующих с нуклеотидным субстратом согласно кристаллической структуре. Замены R288A и N289A получали с помощью сайт-направленного мутагенеза, мутантные варианты PrimPol очищали из клеток-продуцентов *E. coli*.

Замены остатков Asn289 и Arg288 снижали ДНК-полимеразную и ДНК-праймазную активности PrimPol в присутствии ионов Mn^{2+} в качестве кофактора и приводили к полной потере каталитической активности в реакциях с ионами Mg^{2+} . Наибольший эффект оказывала мутация R288A. Обе мутации нарушали формирование комплекса PrimPol-ДНК-АТР-праймер. Был проведен анализ активности и точности мутантных вариантов PrimPol на ДНК-



матрицах с распространенными биологически значимыми повреждениями. Замены R288A, N289A снижали транслезионную активность PrimPol на ДНК с 7,8-дигидро-8-оксогуанином (8-охо-G) и вызывали потерю транслезионной активности на ДНК с Об-метилгуанином (Об-me-G) и 1, N⁶-этноаденином (εA). Мутация N289A значительно снижала активность PrimPol на матрицах с АП-сайтом и тимидингликолем, а замена R288A приводила к полной потере транслезионной активности напротив данных повреждений. Кроме того, обе замены снижали включение некоплементарного dТТР на матрицах с dG и 8-охо-G, а мутантный вариант R288A существенно снижал включение некоплементарного dАТР напротив 8-охо-G.

Полученные результаты свидетельствуют о ключевой роли остатков Asn289 и Arg288 в обеспечении праймазной и ДНК-полимеразной активностей PrimPol и координировании нуклеотидного субстрата напротив неповрежденных и поврежденных нуклеотидов.

Исследование поддержано грантом РНФ 18-14-00354-П «Функциональные свойства нового фермента человека – праймазы-полимеразы PrimPol».

АМИЛОИДНЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА NOS1AP И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С α -СИНУКЛЕИНОМ

Матиив А.Б.¹, Москаленко С.Е.^{1,2}, Журавлева Г.А.¹, Бондарев С.А.¹

¹Кафедра генетики и биотехнологии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербургский филиал, Санкт-Петербург, Россия

antonmattiiv@yandex.ru

Амилоиды представляют собой белковые фибриллы с кросс- β структурой. Многочисленные исследования амилоидных белков вызывают большой интерес в связи с ростом числа случаев таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабета II типа и других, связанных с амилоидами. В результате биоинформатического анализа, проведенного в нашей лаборатории, был идентифицирован белок NOS1AP, как один из компонентов амилоидной сети, включающей APP (белок-предшественник бета-амилоида) и α -синуклеин. Сам белок NOS1AP был предсказан как потенциально амилоидогенный. NOS1AP является адаптерным белком нейрональной синтазы оксида азота 1 (nNOS или NOS1), которая действует в качестве фермента для синтеза оксида азота, и участвует в опосредованной NMDA-рецептором эксайтотоксичности. NOS1AP в своем составе содержит два домена: N-концевой фосфотирозин-связывающий домен (PTB) и C-концевой PDZ-связывающий домен (PDZ-BD), через который он взаимодействует с синтазой оксида азота. Существует связь NOS1AP с различными психическими расстройствами. Варианты гена *NOS1AP* связывают с эндофенотипами шизофрении и симптомами депрессии при шизофрении. Кроме того, варианты *NOS1AP* ассоциированы с тяжестью симптомов при посттравматическом стрессовом расстройстве. Показано, что редкие несинонимичные замены позволяют разделить обсессивно-компульсивное расстройство и расстройство аутистического спектра.



Флуоресцентная микроскопия выявила локальную агрегацию EGFP-NOS1AP в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и культуре клеток человека HEK293T, временно экспрессирующих эту конструкцию. Также нами было показано, что белок EGFP-NOS1AP образует детергент-устойчивые агрегаты в клетках HEK293T при сверхпродукции. Кроме того, было показано, что белки NOS1AP и α -синуклеин физически взаимодействуют в культуре клеток HEK293T. В эксперименте были использованы конструкции, в которых белки были слиты с фрагментами белка Venus (V1 и V2), которые при сближении восстанавливают флуоресцентные свойства. Нами были картированы амилоидогенные фрагменты белка, которые локализованы в позициях 1-291 и 292-390 а.к., соответственно. Таким образом, белок NOS1AP проявляет амилоидные свойства, что представляет большой интерес, учитывая тот факт, что он может взаимодействовать с APP и α -синуклеином, поэтому существует вероятность, что молекулярные механизмы нейродегенеративных заболеваний могут быть более сложными, чем это принято считать в настоящее время.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 20-34-90117).

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЛИЦИЛ-ТРНК-СИНТЕТАЗЫ АРХЕЙ РОДА *HALOBACTERIUM SALINARUM*

Менщикова А.К.^{1,2}, Никонова Е.Ю.², Виноградова Е.С.²

¹ФГАОУ ВО Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия;

²ФГБУН Институт белка РАН, Пушино, Россия

menalisik@yandex.ru

Аминоацил-тРНК синтетазы (aaRS) – ферменты, присутствующие во всех доменах жизни. Они обеспечивают точное образование сложноэфирной связи между аминокислотами и тРНК, антикодон которых соответствует данной аминокислоте. Так же, глицил-тРНК синтетаза (GlyRS) является регулятором трансляции на этапе инициации у энтеровирусов. Глицил-тРНК синтетаза, в силу вариативности своей структуры и особенностей функционирования, является одной из наиболее изучаемых аминоацил-тРНК синтетаз.

Глицил-тРНК синтетаза относится ко II классу аминоацил-тРНК синтетаз, однако, в отличие от других представителей, четвертичные структуры GlyRS не являются филогенетически консервативными. Так глицил-тРНК синтетаза существует в нескольких формах: в виде димера у архей и эукариот, а также у некоторых бактерий; и в виде гетеротетрамера у большинства бактерий. На сегодняшний день определена только одна структура глицил-тРНК синтетазы из архей *Nanoarchaeum equitans*. Как показал рентгеноструктурный анализ GlyRS *N. equitans* является гомологом эукариотической синтетазы.

Мы провели анализ аминокислотных последовательностей глицил-тРНК синтетаз различных архей. GlyRS *Halobacterium salinarum* гомологичен глицил-тРНК синтетазе человека на 98%. Это позволяет нам предположить, что GlyRS *H. Salinarum* также будет образовывать стабильный комплекс с IRES I, как глицил-тРНК синтетаза человека.

На сегодняшний день нами получена генетическая конструкция, несущая ген GlyRS *Hsa*. Так же были подобраны условия экспрессии этого гена в штамме-суперпродуценте *E. coli*



BL21(DE3). Стадии очистки включали в себя ряд хроматографий с использованием таких носителей как Profinity™ IMAC Resin, Ni-charged и HiTrap Heparin High Performance. Заключительный этап очистки – эксклюзионная хроматография на колонке HiLoad 16/60 Superdex 200.

В результате данной работы был получен препарат глицил-тРНК синтетазы *Hsa* в препаративных количествах, пригодный как для изучения его РНК-связывающих свойств, так и для экспериментов по кристаллизации.

ОБРАЩЕНИЕ АКТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ F_1F_0 -АТФазы В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА SUM159 ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА TR57

**Мишук А.А.^{1,2}, Бережнов А.В.³, Одинокова И.В.¹, Мндлян Е.Ю.¹, Fennel E.M.J.⁴,
Aronte-Collazo L.J.⁴, Graves L.M.⁴, Круглов А.Г.¹, Фадеев Р.С.¹, Холмухамедов Э.Л.^{1,4}**

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

²ФГБУН Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН,
Москва, Россия;

³Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушкино, Россия;

⁴Университет Северной Каролины, Чапел-Хилл, США

artem.mishukov1999@gmail.com

Цели и задачи исследования. TR57 – экспериментальный противоопухолевый препарат, единственной молекулярной мишенью которого является митохондриальная матриксная казеинолитическая протеаза ClpP, что делает актуальным исследование молекулярных механизмов, связанных с митохондриями, как одной из мишеней действия TR57. Целью данной работы было изучение последствий действия TR57 на митохондриальные функции в модели культуры клеток рака молочной железы человека SUM159.

Материалы и Методы. Культивирование и обработка клеток SUM159 препаратом TR57 проводились в среде DMEM/F12, 5% FBS, 5 мкг/мл инсулина, 1 мкг/мл гидрокортизона в клеточном инкубаторе. Средний размер митохондрий и количество митохондриальных нуклеоидов оценивались с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии и анализа изображений в программе ImageJ. Анализ содержания белков проводился методом Вестерн блот. Активность дыхательной цепи в суспензии дигитонин-пермеабелизованных клеток измерялась с помощью кислород-чувствительного флуоресцентного зонда. Измерение мембранного потенциала осуществлялось методом флуоресцентной микроскопии и анализа изображений в программе ImageJ.

Результаты. 72 часовая обработка клеток SUM159 150 нМ препарата TR57 индуцирует уменьшение среднего размера митохондрий с $3,40 \pm 0,48$ мкм² до $1,40 \pm 0,15$ мкм², снижение количества митохондриальных нуклеоидов (с 109 ± 13 до 27 ± 8 на клетку), сопровождающееся снижением уровня белков TFAM и TFAM, участвующих в поддержании структуры и экспрессии мтДНК.



Обработка TR57 в течении 72 ч подавляет дыхание в состояниях 3 и 4, а также разобщенное дыхание в дигитонин-пермеабилizованных клетках SUM159 и снижает активность комплекса II с $3,80 \pm 0,59$ нг-атомов-О/мин/ 10^6 до $0,76 \pm 0,10$ нг-атом-О/мин/ 10^6 клеток.

Обработка клеток TR57 в течение 72 часов сопровождается снижением мембранного потенциала в этих клетках на 42%. Интересно отметить, что олигомицин, ингибитор митохондриальной F_0F_1 -АТФазы, вызывает деполяризацию митохондрий TR57-обработанных клеток на 64%, в то время как в контрольных клетках олигомицин-чувствительная компонента мембранного потенциала составляет около 5%.

Заклучение. Препарат TR57 вызывает фрагментацию митохондрий, потерю мтДНК, и подавление активности дыхательной цепи. Однако, ингибирование дыхательной цепи не приводит к потере мембранного потенциала митохондрий в клетках, обработанных TR57. Деполяризующее действие олигомицина на мембранный потенциал в TR57-обработанных клетках указывает на возможное обращение митохондриальной F_0F_1 -АТФазы и использование внемитохондриального АТФ для поддержания мембранного потенциала.

СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ДИСТАНЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ЭЛЕМЕНТАМИ ГЕНОМА НА ПРИМЕРЕ SU(HW)-ЗАВИСИМЫХ КОМПЛЕКСОВ *D. MELANOGASTER*

Молодина В.В., Мельникова Л.С., Андриянова А.А.

ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

molodina_varvara@mail.ru

Пространственная конфигурация ДНК и взаимодействие связанных с ДНК белков играют решающую роль в регуляции транскрипции эукариотического генома. Однако механизмы дистанционных взаимодействий между сложными белковыми комплексами остаются почти не исследованными. В первую очередь, это связано с отсутствием удобных модельных систем.

Мы создали новую модельную систему, позволяющую наглядно демонстрировать функциональное значение дистанционных взаимодействий между регуляторными комплексами, расположенными на большом расстоянии друг от друга. Работа модельной системы тестировалась на примере Su(Hw)-зависимого инсуляторного комплекса *Drosophila melanogaster*. Инсулятор Su(Hw) изучен достаточно хорошо, известны основные белки, входящие в его состав и влияющие на его активность – Su(Hw), Mod(mdg4) и CP190. Мультиплицированные сайты связывания белка Su(Hw) могут поддерживать дистанционные взаимодействия регуляторных элементов в трансгенных линиях.

Для изучения дистанционных взаимодействий между Su(Hw)-зависимыми комплексами с помощью системы CRISPR/Cas9 получены 2 трансгенные линии, каждая из которых содержит сайт *attP* в районе 48С хромосомы 2R. Расстояние между сайтами составляет около 40 т.п.н. С помощью *phi31*-зависимой интеграции в линии встроены ряд конструкций, позволяющих изучать взаимодействие между Su(Hw)-зависимыми инсуляторами на гомологичных хромосомах; 1) когда обе конструкции находятся в одном



месте генома (транскрипция); 2) когда конструкции находятся в разных местах генома (дистанционное взаимодействие в транс-положении). Для сборки Su(Hw)-зависимого комплекса использованы 4 сайта связывания белка Su(Hw). Взаимодействие между инсуляторами легко определяется по экспрессии модельных генов *yellow* (отвечает за окраску кутикулярных структур) и *white* (отвечает за окраску глаз). В созданной нами системе энхансеры и активируемые ими модельные гены расположены на гомологичных хромосомах. Мы доказали, что они способны сближаться и взаимодействовать только при наличии в составе конструкций сайтов связывания Su(Hw). При этом сами инсуляторные комплексы не влияют на транскрипцию модельных генов. В полученных конструкциях сайты связывания белка Su(Hw) могут быть заменены на сайты связывания любого другого белка. Поэтому созданная модельная система может использоваться для изучения взаимодействия между белками высших эукариот, гомологичными белкам дрозофилы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00719).

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИИ РЕЦЕПТОРА СЛЕДОВЫХ АМИНОВ TAAR9

Муртазина Р.З., Канов Е.В., Куварзин С.Р., Жуков И.С., Гайнетдинов Р.Р.

Лаборатория нейробиологии и молекулярной фармакологии Института трансляционной биомедицины, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский Государственный Университет,
Санкт-Петербург, Россия

ramilya.murtazina@gmail.com

Семейство рецепторов следовых аминов (trace amine-associated receptors, TAARs) относится к большой группе G-белок связанных рецепторов, открытых в 2001 году. Наиболее известный член этого семейства TAAR1 является перспективной мишенью для лечения шизофрении. Про остальные 5 членов семейства TAAR человека известно гораздо меньше. Известно, что TAAR экспрессируются в обонятельном эпителии, однако, в последних исследованиях описывается возможная роль данных рецепторов не только в обонянии, но и в ЦНС, а также на периферии. В рамках данного исследования была разработана и оптимизирована генетическая конструкция для транзientной экспрессии TAAR9 крысы в эукариотических клетках линии HEK293T. Для повышения уровня плазматического экспрессии был использован N-концевой таг, состоящий из 9 первых аминокислот бета2-адренергического рецептора. Для оценки мембранной экспрессии TAAR9, что критично для функционирования GPCR, также была создана генетическая конструкция для экспрессии гибридного белка TAAR9-GFP. Благодаря этому было показано, что TAAR9 слабо экспрессируется на мембране клеток. Далее был проведен скрининг 48 соединений (амины, одоранты, нейромедиаторы) методом биолюминесцентного резонансного переноса энергии (BRET), направленного на Gαs-зависимые сигнальные пути. Было показано, что сигналинг TAAR9 активируется в ответ на N-метилпиперидин (EC50 = 87 μM).

Помимо исследования функции рецептора *in vitro*, методом CRISPR/Cas9 были созданы две линии крыс породы Sprague Dawley с мутациями, приводящими к нокауту гена TAAR9 (*insA* и *delC*). Была проведена сравнительная оценка поведения в стандартных тестах



(Открытое поле, Крестообразный приподнятый лабиринт, Т-тест, стресс-индуцированная гипертермия). В ходе исследования были выявлены незначительные изменения в поведении, было показано, что при стрессе у нокаутных животных была изменена температура по сравнению с диким типом. Также был проведен сравнительный анализ ряда гематологических и биохимических показателей крови, в частности, общий анализ крови, тест на осмотическую хрупкость эритроцитов и скрининг панели основных биохимических показателей. Большинство гематологических и биохимических параметров у нокаутных животных не менялось. Однако, биохимический анализ выявил снижение уровня общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой плотности в крови крыс TAAR9-KO обеих линий, что доказывает неслучайность данного изменения. На данный момент роль TAAR9 в терморегуляции, а также регуляции путей липидного обмена остается неизученной.

Работа проведена при поддержке гранта РФФИ 20-34-90099.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ ГЕНА ANT25 В БИОСИНТЕЗЕ ПРОАНТОЦИАНИДИНОВ ЯЧМЕНЯ

Муханова М.А.^{1,2}, Шоева О.Ю.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия;

²ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

m.shishkina@g.nsu.ru

Проантоцианидины представляют собой олигомерные флавоноидные соединения, относящиеся к классу растительных полифенолов. Благодаря антиоксидантной активности они участвуют в защите растений от фитофагов и патогенов. И вместе с тем, актуальным направлением селекции ячменя является получение сортов, у которых отсутствует или снижен биосинтез этих веществ: показано их негативное влияние на усвоение корма и набор массы у сельскохозяйственной птицы, и на коллоидную стойкость пива. Была создана коллекция мутантов с нарушенным синтезом проантоцианидинов и родственных им антоцианов, насчитывающая 766 индивидуальных мутантов, которые с помощью тестов на аллелизм были сгруппированы в 30 групп комплементации, или локусов (Lundqvist, 2014).

Неудачные попытки использовать в селекции беспроантоцианидиновых сортов мутанты, у которых мутации затрагивали гены основного пути биосинтеза флавоноидов, объясняются важностью этих соединений в росте и развитии растений (Dixon et al., 2005). Чтобы минимизировать негативные последствия от таких мутаций, были предприняты попытки использовать линии, в которых мутации затрагивали только синтез проантоцианидинов, тогда как синтез других флавоноидных соединений, включая антоцианы, не менялся, либо изменялся незначительно. К таким мутантам относится *ant25.264*, полученный на основе сорта Secobra18193 с помощью химического мутагенеза. Однако локализация гена *Ant25* и его молекулярные функции до сих пор не известны. Целью работы является исследование функциональной роли гена *Ant25* в биосинтезе проантоцианидинов ячменя. Исследование проводилось с помощью анализа функциональной активности генов общего фенилпропаноидного (*Pal*) и флавоноидного (*F3h* и *Lcr*) путей биосинтеза в зерне у



мутанта *ant25.264* и сорта Secobra 18193. Для этого проводилось выделение РНК в трех повторностях из развивающегося колоса и зерна на ранней молочной и восковой стадиях спелости у мутанта *ant25.264* и сорта Secobra 18193. С помощью реакции обратной транскрипции, на основе выделенной РНК получили кДНК, которая далее использовалась для проведения ПЦР в режиме реального времени для оценки количественного содержания транскриптов генов *Pal*, *F3h*, *Lcr*. В ходе исследования было показано значимое снижение экспрессии этих генов у мутанта по сравнению с родительским сортом. На основе полученных результатов был сделан вывод о регуляторной роли гена *Ant25* в биосинтезе проантоцианидинов в зерне ячменя.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 21-76-10024.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИСТЕМ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПОТОМКОВ

Осяева Е.Н.¹, Иванова Ю.С.², Пуговкина Н.А.², Гурьев Н.А.³, Люблинская О.Г.²

¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

ketosaeva2000@gmail.com

Продукты аэробного метаболизма, низкомолекулярные кислородсодержащие соединения, обозначаемые общим термином активные формы кислорода (АФК), являются участниками многих внутриклеточных метаболических и сигнальных процессов, и одновременно – опасными токсикантами. Наиболее стабильным и долгоживущим представителем семейства АФК является перекись водорода (H_2O_2). Избыточное накопление в клетках H_2O_2 может приводить к повреждению биомолекул, клеточному старению и гибели. Ранее изучение процессов, связанных с колебаниями уровня H_2O_2 , затруднялось отсутствием надежных методов детекции H_2O_2 в живых клетках, но недавнее изобретение генетически-кодируемого сенсора H_2O_2 HyPer (Belousov et al., 2006) позволило продвинуться вперед в решении этих задач.

В данной работе мы используем основанную на применении HyPer методику количественной оценки внутриклеточного уровня H_2O_2 (Lyublinskaya and Antunes, 2019) для оценки активности системы антиоксидантной защиты в клетках человека разных фенотипов. Измеряя в условиях внешнего окислительного стресса концентрацию внутриклеточной перекиси, мы определяем градиент между экстраклеточным и внутриклеточным уровнем H_2O_2 , что позволяет количественно охарактеризовать способность клеток справляться с избытком H_2O_2 .

В исследовании были использованы несколько клеточных линий, экспрессирующих HyPer в цитоплазме: нормальные клетки человека – мезенхимальные стволовые клетки (МСК), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), полученные путем репрограммирования МСК, дифференцированные потомки иПСК с фенотипом, близким к пародитермическим МСК (иПСК-МСК) – а также две клеточные линии опухолевых клеток



человека (HeLa и K562). Обнаружено, что в используемых нами опухолевых клетках защита от H_2O_2 менее эффективна, чем в нормальных клетках. Значение градиента H_2O_2 исчисляется в сотнях или тысячах раз в зависимости от типа клеток и зависит от окислительной нагрузки на клетки, снижаясь при её увеличении. При значительных нагрузках, приводящих к истощению системы тиоредоксина, градиент H_2O_2 стабилизируется. Апробированный в работе метод можно применить для изучения окислительно-восстановительных систем и в других клетках человека, а также использовать для работы с другими генетически-кодированными сенсорами редокс-активных веществ.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 21-74-20178.

СИСТЕМА РЕПАРАЦИИ «МИСМАТЧЕЙ» РАСПОЗНАЕТ N²-ГЕТЕРОАРИЛЬНЫЕ АДДУКТЫ ГУАНОЗИНА В ДНК

Павлова А.В.¹, Маруяма А.², Масаки И.², Монахова М.В.³, Сейо К.², Кубарева Е.А.³

¹Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²Кафедра естественных наук и технологий, Токийский технологический институт, Токио, Япония;

³НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

p.anzhela98@gmail.com

Репарация «мисматчей» в ДНК (MMR) играет важную роль в поддержании стабильности генома. Белок MutS отвечает за распознавание «мисматчей» – ошибок, возникающих в ходе репликации ДНК, а также за последующее привлечение белков MutL и MutH в *E. coli*. Чувствительная к профилю метилирования ДНК никующая эндонуклеаза MutH вносит одноцепочечный разрыв в «дочернюю» цепь, а MutL осуществляет координацию данного процесса, взаимодействуя с MutS и активируя MutH. Белки MMR могут участвовать в распознавании ряда других повреждений ДНК, включая некоторые объёмные аддукты нуклеотидов, которые, как правило, являются субстратами системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER). В данной работе мы демонстрируем новые данные, которые свидетельствуют о перекрывании функций между системами MMR и NER.

Нами исследовано связывание ДНК с модифицированным N²-гетероарил-дезоксигуанозином (HA-dG) белками MMR *E. coli*. Используемые модельные аддукты гуанина с шестью типами шестичленных гетероароматических колец, содержащих один или два атома азота (производные пиридина, пиридазина, пиримидина или пиразина), напоминают аддукты с гетероциклическими аминами – канцерогенами, которые встречаются в табачном дыме и жареном мясе. Методом «торможения в геле» показано, что эффективность комплексообразования MutS с 17-звенными дуплексами, содержащими N²-гетероарил-производные dG (HA-ДНК) как в составе пары с dC, так и в составе пары с T, в 2–4 раза выше, чем с немодифицированной ДНК с G/T-«мисматчем». Корреляция между стабильностью HA-ДНК дуплексов и их сродством к MutS не обнаружена. Моделирование комплекса между HA-ДНК и MutS методом молекулярной динамики показало, что высокое сродство к ДНК,



содержащей как HA-dG/T, так и HA-dG/C, может быть обусловлено взаимодействием ДНК-связывающего центра белка с гетероароматической модификацией dG. Таким образом, возможно, мы открыли новый механизм связывания MutS с HA-ДНК, отличный от взаимодействия этого белка с «мисматчем». Проанализирована активация начального этапа MMR, представляющего собой расщепление HA-ДНК комплексом ферментов MutS, MutL и MutH *E. coli*. Все модельные ДНК с HA-dG инициировали репарацию независимо от наличия в них пары G/T. Однако эффективность этого процесса была различной (продемонстрировано как увеличение, так и уменьшение доли ДНК с внесенным разрывом по сравнению с G/T-«мисматчем») и не зависела от сродства HA-ДНК к MutS или к MutL. Вероятно, существует пока не выявленный структурный фактор в HA-dG, влияющий на инициацию MMR.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-14-00161).

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЭНХАНСЕРА p53RE 75C6 НА МОДЕЛЬНОМ ОБЪЕКТЕ *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**Пантелеев Д.Д.¹, Лебедева Л.А.¹, Конова К.Ю.¹, Коробов В.С.¹,
Иващенко С.Д.¹, Шедл П.^{1,2}, Шидловский Ю.В.^{1,3}**

¹Лаборатория регуляции экспрессии генов в развитии, ФГБУН Институт биологии гена РАН,
Москва, Россия;

²Лаборатория молекулярной биологии, Принстонский университет, Принстон, США;

³Кафедра биологии и общей генетики, ГБОУ ВПО Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

matt.panteleev@mail.ru

Белок p53 является высококонсервативным фактором транскрипции, который активируется при повреждении ДНК, например, при облучении клетки. На сегодняшний день известно несколько генов, которые активируются p53-зависимым энхансером p53RE 75C6 у дрозофилы – *reaper (rpr)*, *sickle (skl)*, *head involution defective (hid)*, а также *Xrp1*. Если первые три гена располагаются вблизи от p53RE, то *Xrp1* – на расстоянии 20 Mb от энхансерной области, что является уникальным примером транс-активации (так как они располагаются на разных плечах хромосомы), а также супер-дальнего взаимодействия. Молекулярный механизм, обеспечивающий взаимодействие между *Xrp1* и p53RE, неизвестен. Одним из предполагаемых механизмов является участие специфических архитектурных элементов, инсуляторов, которые играют ключевую роль в формировании хромосомной структуры высокого порядка. В соответствии с этой гипотезой, методом ChIP было обнаружено, что некоторые белки, участвующие в инсуляции (GAF, Su(Hw) и CTCF), располагаются около последовательности p53RE. Эти факторы также находятся в непосредственной близости от гена *Xrp1*.

Мы используем два основных подхода для выяснения механизма дальних взаимодействий p53RE – *Xrp1*. Во-первых, мы провели мутагенез области p53RE. Фрагмент 6 тпн, содержащий 75C6 энхансер, был удален с помощью метода CRISPR/Cas9 и заменен



мутантными вариантами этой области. Мы удалили у мутантов сайты связывания инсульторных белков, сайт связывания p53 в различных комбинациях, а также изменили ориентацию всей области. Мы проводим облучение полученных линий дрозофилы на эмбриональной стадии развития, и с помощью метода FISH изучаем влияние этих замен на формирование контактов p53RE – *Xrp1* в пространстве ядер с помощью конфокальной микроскопии. Во-вторых, ген *Xrp1* был разделен на шесть частей, с целью найти область, ответственную за формирование контакта с p53RE. Каждый из этих фрагментов был помещен в репортерную конструкцию с геном GFP, а затем интегрирован в различные сайты генома. У полученных линий мы проверяем активацию репортера при облучении для проверки позиционных и ориентационных эффектов изучаемого взаимодействия.

Таким образом, наше исследование позволит выявить последовательности ДНК и белковые факторы, которые необходимы для формирования дальних взаимодействий энхансером p53RE 75C6.

Эта работа была поддержана грантом Российского научного фонда 20-14-00201.

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH И ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2

Паншин Д.Д., Лобов А.А., Малашичева А.Б.

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

dany.panshin@yandex.ru

Внутриклеточный домен NOTCH и транскрипционный фактор RUNX2 – важные и консервативные регуляторы клеточной судьбы. Сигнальный путь Notch регулирует широкий спектр клеточных процессов в организме, играя важную роль в процессах эмбрионального развития и поддержании тканевого гомеостаза. Различные нарушения его регуляции влекут за собой аномалии развития и появление целого ряда заболеваний, в том числе рака. Основная роль транскрипционного фактора RUNX2 заключается в регуляции развития остеобластов и формировании костей в организме. В то же время, гиперэкспрессия RUNX2 характерна для метастатических раковых заболеваний и, по-видимому, его роль шире, чем контроль остеогенной дифференцировки.

Процессы, регулируемые сигнальным путем Notch и RUNX2, в значительной степени перекрываются, однако ранее не было показано прямой взаимосвязи этих сигнальных путей. Чтобы это проверить мы оценили эффект гиперэкспрессии RUNX2 и внутриклеточного домена NOTCH на экспрессию генов, связанных с этими сигнальными каскадами.

Для активации сигнального пути Notch и RUNX2 мы провели трансфекцию клеток HeLa плазмидами, несущими полноразмерный транскрипт RUNX2 и последовательность, соответствующую внутриклеточному домену NOTCH1 (N1ICD), после чего выделили РНК, и оценили уровень экспрессии RUNX2 и NOTCH, а также их генов-мишеней, при помощи ПЦР в реальном времени. Параллельно, из этих же образцов был выделен белок и проведён скорострельный протеомный анализ.



Активация RUNX2 в клетках HeLa приводила к увеличению экспрессии компонентов сигнального пути Notch (NOTCH1 и NOTCH2), а также гена-мишени Notch (HES1), что свидетельствует об активации этого сигнального пути при оверэкспрессии RUNX2. Аналогичные данные были получены и в результате протемного анализа. Нам удалось идентифицировать белки, соответствующие 4053 генам, 3471 из которых были включены для статистического анализа. RUNX2 был детектирован во всех экспериментальных образцах, при трансфекции конструкциями с NICD и RUNX2, но не в контрольных клетках HeLa. Примечательно, что уровень RUNX2 в клетках трансфицированных обеими плазмидами, был достоверно ниже, чем уровень при трансфекции только конструкцией RUNX2. Можно предположить, что NICD активирует экспрессию RUNX2, но в то же время не дает ей подниматься выше определенного уровня.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ номер 18-14-00152-П.

НОКАУТ ПО ГЕНУ *PTEN* ПРИВОДИТ К ЗАПУСКУ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Парфенова П.С.^{1,2}, Дерябин П.И.¹, Шатрова А.Н.³, Бородкина А.В.¹

¹Группа механизмов клеточного старения, ФГБУН Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³Лаборатория динамики внутриклеточных мембран, ФГБУН Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург, Россия

sucrederaisin@gmail.com

На сегодняшний день взаимосвязь клеточного старения и организма считается почти аксиомой современной биологии развития. А накопление старых клеток сопровождается развитием целого ряда возраст-ассоциированных патологических изменений. Помимо репликативного старения, связанного с укорочением теломер, сегодня выделяют другие типы клеточного старения, вызванные стрессовыми факторами (тепловой шок, оксидативный стресс и др.), накоплением онкогенов, потерей онкосупрессоров, а в случае раковых клеток – это старение, вызванное радио- и химиотерапией.

В настоящий момент известно, что мутация в гене *PTEN*, онкосупрессоре, может приводить к развитию уникального типа клеточного старения – *PTEN*-loss-induced senescence (PICS). Вместе с тем, его мутация или полная делеция обнаруживается в ряде раковых образований тканей мозга, легких, простаты и эндометрия. При этом в эндометрии в порядка 40% случаев развития гиперплазии и аденокарциномы *PTEN* оказывается мутирован, однако работы, в которых исследовался бы характер поведения нормальной здоровой ткани при делеции этого гена, практически отсутствуют. В связи с этим цель настоящего исследования заключается в характеристике эндометриальных стромальных клеток человека (эСК) с нокаутом по *PTEN*.

В данной работе эСК (линия 2804) были модифицированы с помощью лентивирусной CRISPR/Cas9 системы. Для корректного наведения эндонуклеазы Cas9 и нокаута гена *PTEN*



были подобраны три варианта смысловых гидРНК, комплиментарных последовательностям первого экзона гена *PTEN*. Несмысловая гидРНК была использована в качестве контроля. ГидРНК были клонированы в модифицированную версию лентивектора lentiCRISPRv2. Выбор оптимальной гидРНК для нокаута гена *PTEN* был осуществлен при помощи методов PCR и Western Blotting.

Клетки с нокаутом по *PTEN* характеризовались остановкой пролиферации, увеличением размера и автофлуоресценции, активацией p53/p21/Rb и АКТ/mTOR сигнальных каскадов, усилением окрашивания на SA-b-Gal. Кроме того, в таких клетках выявлялось накопление активных форм кислорода и падение мембранного потенциала митохондрий, отражающие нарушение работы митохондрий. Совокупность полученных результатов свидетельствует об индукции преждевременного старения в ЭСК при нокауте *PTEN*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 19-74-10038).

ИЗУЧЕНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В МОДЕЛИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ОСТЕОБЛАСТАМИ

Переплетчикова Д.А.¹, Костина Д.А.¹, Карелкин В.В.², Лобов А.А.¹, Малашичева А.Б.¹

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

dasha_perepletch@mail.ru

Все мезенхимные стволовые клетки (МСК) способны дифференцироваться в адипо-, хондро- и остеогенном направлениях *in vitro*. В то же время, механизмы индукции и протекания дифференцировки МСК *in vivo* все еще фрагментарно изучены. Так, известно, что эндотелий способен индуцировать остеогенную дифференцировку МСК, а взаимодействие эндотелия и мезенхимных клеток является центральным в остеогенезе. Однако комплексной картины о молекулярных механизмах остеоиндукции при взаимодействии эндотелиальных клеток и МСК до сих пор нет.

Цель данной работы состоит в изучении молекулярных механизмов, влияющих на процессы дифференцировки МСК, обусловленных остеоиндуктивным эффектом эндотелиальных клеток. Была разработана система сокультивирования в условиях непосредственного контакта двух типов клеток: первичной культуры остеобластов и эндотелиальных клеток пупочного канатика. Методом ПЦР в реальном времени, мы оценивали изменения уровней экспрессии генов, вовлеченных в остеогенную дифференцировку, (1) в смешанной культуре остеобластов и эндотелиальных клеток, (2) в контрольных монокультурах остеобластов и эндотелия и (3) в культуре остеобластов и эндотелиальных клеток, разделенных после сокультивирования при помощи магнитного сортирования по эндотелиальному маркеру CD31. Эффективность сортировки оценивали с помощью анализа экспрессии маркера CD31. Отсортированные эндотелиальные клетки экспрессируют CD31, в отличие от отсортированных остеобластов и образцов смешанной культуры без сортирования, где уровень экспрессии CD31 значительно ниже. Это свидетельствует о высокой эффективности сортирования.



По результатам анализа экспрессии генов, вовлеченных в остеогенную дифференцировку, были выявлены значительные различия между контрольными культурами клеток и клетками в сокультивировании. В первую очередь в ко-культурах мы обнаружили повышение экспрессии компонентов и мишеней сигнального пути Notch: HEY1, DLL4, JAG. Также при сокультивировании происходит повышение экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки (ACTA2 и RUNX2) и генов, связанных с эндотелиально-мезенхимным переходом (SNAIL и SLUG).

Таким образом, эндотелиальные клетки непосредственно влияют на процессы остеогенной дифференцировки МСК, а остеоиндуктивный эффект связан с активацией сигнального пути Notch. Для подтверждения этого мы планируем дополнить полученные данные экспериментами с сокультивированием клеток в бесконтактных условиях.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-74-10077.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ RAPD-МАРКЕРОВ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ *QUERCUS ROBUR* L. И *PINUS SYLVESTRIS* L.

Петюренко М.Ю., Ржевский С.Г.

ФГБУ Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, Воронеж, Россия

slavaosin@yandex.ru

Различные методы генетической паспортизации и идентификации растений находят широкое применение в современном лесном хозяйстве, одним из них является проведение полимеразной цепной реакции со случайными RAPD-праймерами. Этот анализ позволяет оценивать полиморфизм ДНК с использованием одиночных коротких праймеров произвольной нуклеотидной последовательности.

В данной работе представлен результат использования RAPD-маркеров с целью анализа генетического полиморфизма для деревьев внутри видов *Pinus sylvestris* L. и *Quercus robur* L.

Для работы использовался материал, отобранный у дуба черешчатого 40-летнего возраста, произрастающего на лесосеменной плантации в Семилукском лесопитомнике Воронежской области, а также у лесных культур сосны обыкновенной, произрастающей в Кантемировском районе Воронежской области. Выделение ДНК из хвои производилось с использованием набора diaGene (Диаэм), а из вегетативных тканей дуба с применением СТАВ-метода. Для проведения ПЦР-реакции использовался следующий набор RAPD-маркеров: UBC-157, UBC-180, UBC-99, UBC-457, UBC-459, UBC-515. Условия амплификации и последовательности RAPD-маркеров были взяты из литературных данных. Электрофорез продуктов ПЦР проводился в 2,5% агарозном геле.

Все использованные RAPD-маркеры продемонстрировали наличие продуктов амплификации у обоих видов. Для сосны обыкновенной мономорфными оказались маркеры UBC-457 и UBC-515, для дуба все RAPD-маркеры проявили полиморфизм. Также ранее данный набор праймеров был использован для генотипирования различных представителей рода *Populus*, в том числе искусственно созданных сортов и гибридов, при этом все локусы оказались полиморфными.



Результат исследования подтверждает перспективность применения RAPD-маркеров, использованных в работе для генотипирования лесных древесных пород. Одни и те же праймеры RAPD могут давать продукты амплификации у представителей древесных видов, относящихся к разным отделам растений, однако уровень их полиморфизма может различаться. Преимуществами использованного метода является техническая простота его реализации, и универсальность применения для разных видов. В то же время, отмечен недостаток RAPD-анализа, заключающийся в слабой повторяемости результатов.

РЕТИНОВЕЕВЫЙ СИГНАЛИНГ У ЛИЧИНКИ И ЮВЕНИЛЬНОГО ЧЕРВЯ *PLATYNEREIS DUMERILII* РАЗЛИЧАЕТСЯ НА УРОВНЕ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Потапова С.С., Кулакова М.А.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

sofiya-potapova@mail.ru

Ретиноевая кислота (RA) – производное ретинола (витамина А). Это морфоген, который управляет транскрипцией множества генов, в том числе генов Нох-кластера, в процессе развития и регенерации. Известно, что у позвоночных животных RA контролирует экспрессию генов путем связывания с внутриядерными рецепторами RAR (Retinoic Acid Receptor) и RXR (Retinoid X Receptor). Они образуют гетеродимер, который распознаёт RAREs (Retinoic Acid Response Elements) в регуляторных областях генов-мишеней. Рецептор RAR связывает all-trans RA, в то время как RXR может связывать 9-cis-RA и ненасыщенные жирные кислоты. Показано, что RXR способен образовывать гетеродимеры с RAR и другими ядерными рецепторами, включая рецептор гормона щитовидной железы, рецептор витамина D и рецептор эрдизона. После того, как RA оказала свое биологическое действие, ферменты Cyp26 из суперсемейства цитохромов P450 преобразуют ее в биологически неактивные метаболиты. Эволюция сигнального пути RA трудна для изучения. Известно, что модельные Protostomia из линии Ecdysozoa (муха и нематода) утратили многие компоненты этого сигналинга, а базальные линияющие (Priapulida) пока недоступны для экспериментальной работы. У спиральных животных (Lophotrochozoa) репертуар генов-компонентов RA-сигналинга сохранился лучше. Наша модель *Platynereis dumerilii* – аннелида с непрямой типом развития. Мы клонировали гены *Pdum-RAR*, *Pdum-RXR* и *Pdum-Cyp26* и исследовали паттерны их транскрипции методом WMISH. Оказалось, что *Pdum-RAR* транскрибируется преимущественно у личинок, но не у ювенильных червей. Ранее, мы обнаружили, что RA-зависимые гены (Нох-гены и *Pdum-Cad*) по-разному откликаются на экзогенную RA на стадии личинки и червя. Вероятно, в постларвальный период происходит переключение с одной RA-зависимой регуляции на другую за счёт появления нового партнёра у рецептора RXR. Показательно, что в этот период экзогенная RA вызывает усиление экспрессии *Pdum-Cyp26* и некоторых других генов, т.е. между RA и ферментом её катаболизма существует прямая регуляторная связь, но она реализуется не через RAR-RXR-димер. Наше исследование находится в русле теории о первичной гетерономности сегментов, согласно которой ларвальные и постларвальные метамеры формируются из разных клеточных источников и на базе разных морфогенетических программ. Разница между наборами внутриядерных рецепторов у личинки и ювенильного червя *P. dumerilii* означает различия на уровне подконтрольных мишеней древнего сигнального пути RA в ларвальных и постларвальных сегментах.



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛУЧЕННОГО ИЗ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕМИНОМ СЫВОРОТОЧНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А, НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Раззорова Е.А., Чурина Т.С., Горшкова Е.Н.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

elizavetarazzorenova1966@yandex.ru

Исследование эффекторных возможностей иммуноглобулина А (IgA) является категоричным для понимания роли этих антител в IgA-обогащенных препаратах иммуноглобулинов (комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП)), учитывая, что, в зависимости от условий, эти антитела могут опосредовать как про-, так и противо воспалительные функции. Ранее нами было показано, что обработка IgA гемином (комплексом протопорфирина IX и железа) может ограниченно расширять спектр распознаваемых им антигенов. Однако, не ясно, может ли такая модификация повлиять на эффекторные функции IgA и, как следствие, опосредовать более сложные и многогранные режимы действия КИП. Иммуномодулирующие эффекты IgA связаны с сигнализацией через FcαRI, широко экспрессируемым на нейтрофильных гранулоцитах, жизнеспособный статус которых имеет принципиальное значение для иммунитета. Таким образом, целью работы явилось исследование влияния обработки гемином сывороточного IgA, выделенного из КИП, на выживаемость нейтрофилов.

В работе были использованы: сывороточный IgA1 человека, выделенный из КИП (Микроген, Россия); раствор гема. IgA1 (2,5 мг/мл) обрабатывали гемином в молярном соотношении 1:10 (30 мин, 4 °C) и диализовали против PBS в течение 48 ч. Нейтрофилы, выделенные из периферической крови условно здоровых добровольцев, стимулировали (15 мин, 37 °C) с помощью TNF-α (25 нг/мл на $1 \cdot 10^6$ кл/мл) и LPS (100 нг/мл на $1 \cdot 10^6$ кл/мл). Суспензию нейтрофилов ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) инкубировали с нативным и гемином обработанным IgA (25 ч, 37 °C). К клеткам добавляли йодистый пропидий (ThermoFisher, США) и аннексин (BD Biosciences, США) и оценивали их жизнеспособность с помощью проточного цитофлуориметра (Cytoflex, Beckman Coulter, Россия). Полученные данные (по 5 донорам) статистически обрабатывали с использованием критерия Манна-Уитни. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Было установлено, что инкубация нейтрофилов с обработанным гемином IgA1 запускает их гибель, регистрируемую с помощью йодистого пропидия. При этом для TNF-стимулированных нейтрофилов статистически значимое снижение их жизнеспособности регистрируется в более ранние временные точки (начиная со 2 ч), но не в более поздние (20 и 25 ч), по сравнению с интактными или LPS-стимулированными клетками. Также только для TNF-стимулированных нейтрофилов выявлено регистрируемое с помощью аннексина снижение выживаемости на 4 ч их инкубации с гемином-модифицированным IgA1.



АКТИВАЦИЯ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ N-КОНЦЕВОГО АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ГИСТОНА 1

**Репкин Е.А.¹, Переплетчикова Д.А.¹, Костина Д.А.¹, Зайнуллина Б.Р.²,
Малашичева А.Б.¹, Лобов А.А.¹**

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

erepkin53@gmail.com

Эндотелий способен воспринимать целый комплекс стимулов из кровотока и не только менять свою физиологию в ответ на эти стимулы, но и инструктировать подлежащие ткани к определенным физиологическим реакциям. Напряжение сдвига – это один из важных факторов, оказывающих значительное влияние на эндотелий и способный провоцировать различные патологии, например, приводить к эктопической кальцификации сердечно-сосудистой системы.

Сигнальный путь Notch связан как с напряжением сдвига, так и с кальцификацией сердечно-сосудистой системы. Из-за того, что передача сигнала Notch осуществляется за счет непосредственного контакта рецептора и лиганда на поверхности соседних клеток, этот сигналинг чувствителен к механическому напряжению. Можно предложить, что длительное воздействие напряжения сдвига приводит к дисрегуляции этого сигнального пути и изменениям в свойствах эндотелиальных клеток. Такие длительные воздействия часто ассоциированы с изменениями в эпигенетическом профиле.

Мы провели анализ изменений гистоновых кодов (анализ пост-трансляционных модификаций гистонов) эндотелиальных клеток в ответ на активацию сигнального пути Notch. Для этого проводили лентивирусную трансдукцию эндотелиальных клеток пупочного канатика человека конструкцией для оверэкспрессии внутриклеточного домена NOTCH1. Затем, проводили выделение гистонов из контрольных клеток и клеток с активированным Notch-сигналингом и их анализ при помощи скорострельной протеомики.

Среди модифицированных пептидов гистонов пептиды, ацетилированные на N-конце белка, имели сравнительно высокое обилие. Всего для статистического анализа было использовано 162 N-ацетилированных пептида, 21 из которых статистически значимо менял уровень экспрессии при активации сигнального пути Notch. 9 из них принадлежали подтипам гистона 1: H1-5, H1-3, H1-0, H1-4, H1-10. Для всех них было обнаружено увеличение количества N-ацетилированных пептидов при активации сигнального пути Notch. Гистон 1 изучен меньше других гистонов, однако известно, что его N-концевое ацетилирование может быть связано с эпигенетической регуляцией экспрессии.

Таким образом, активация сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках приводит к изменениям их эпигенетического профиля.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 20-74-10077.



НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ РЕКОМБИНАНТНОГО HSELENOM НА КЛЕТКИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ

Рогачев В.В.

ФГБУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

vladimirrogachev6@gmail.com

Эксайтотоксичность – один из основных патологических процессов, связанных с глутаматными рецепторами и ведущий к гибели нейронов. Основой начала процесса является избыточное накопление глутамата в межклеточном пространстве и гиперстимуляции глутаматных рецепторов. Так как глутаматные рецепторы являются кальциевыми каналами, постоянное нахождение в открытом состоянии приводит к избытку кальция в цитозоле и последующему апоптозу. Развитие эксайтотоксичности связано с черепно-мозговыми травмами, раком, инсультом, повреждением спинного мозга и нейродегенеративными заболеваниями.

SELENOM – белок, встречающийся у разных видов и классов животных, принадлежащий к семейству белков с тиоредоксиноподобной укладкой: он имеет консервативный мотив CXXU в каталитическом центре (где С – цистеин, Х – любые две аминокислоты, U – селеноцистеин).

Полученный рекомбинантный селенопротеин М (SELENOM) добавляли к клеткам коры мозга мыши на 24 часа, после чего моделировали условия глутаматной эксайтотоксичности (GluTox) добавлением 300 мкг/мл глутамата на 24 часа. После воздействия глутамата клетки загружали флуоресцентными зондами – йодидом пропидия и Hoechst33342, которые окрашивают ядра клеток с некрозом и ядра живых клеток, соответственно. Было установлено, что флуоресценция Hoechst33342 выше в 4–6 раз в апоптотических клетках, по сравнению с контролем. Наши эксперименты показали, что в контрольных культурах коры мозга некроз выявляется только в одиночных клетках, а апоптоз в $7\pm 3\%$ клеток. После 24-х часового воздействия GluTox в культурах регистрируется апоптоз на ранней стадии в $8\pm 4\%$ клеток, поздние стадии апоптоза в $16\pm 5\%$ клеток и некроз в $63\pm 11\%$ клеток. Предварительная инкубация культур коры мозга с 5 мкг/мл SELENOM снижает число клеток с GluTox-индуцированным ранним апоптозом до $48\pm 7\%$ и поздним апоптозом до $18\pm 4\%$, а число некротических клеток снижается до $27\pm 4\%$. Увеличение концентрации экзогенного SELENOM до 20 мкг/мл приводит к еще более выраженному снижению числа клеток с ранним апоптозом ($18\pm 5\%$), процент клеток на поздних стадиях апоптоза достоверно не меняется при сравнении с 5 мкг/мл SELENOM. При этом число клеток с GluTox-индуцированным некрозом составляет $18\pm 6\%$ клеток. Таким образом, экзогенный SELENOM дозозависимо подавляет гибель клеток коры мозга вследствие некроза, вызываемого высокими концентрациями глутамата. При этом происходит и значительное ингибирование поздних стадий апоптоза со сдвигом в сторону обратимых ранних стадий апоптоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента РФ – МД-752.2022.1.4.



АНАЛИЗ АМИЛОИДОГЕННЫХ СВОЙСТВ РЯДА ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В ОНКОГЕНЕЗЕ

**Рябинина М.В.¹, Зелинский А.А.¹, Козлова А.В.¹, Солодухина У.Н.¹,
Рубель А.А.^{1,2}, Чернов Ю.О.³**

¹Лаборатория биологии амилоидов, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²Кафедра генетики и биотехнологии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³Технологический институт Джорджии, Атланта, США

marina.ryabinina.v@gmail.com

Целый ряд заболеваний человека и животных связан с формированием фибриллярных агрегатов (амилоидов) различными белками. В настоящий момент у человека выявлено около 40 различных белков, которые связаны с развитием более 70-ти амилоидных заболеваний (амилоидозов). Наиболее известными амилоидозами являются болезни Паркинсона и Альцгеймера, хорея Гентингтона, диабет II типа, прионные заболевания. С амилоидами связывают также одну из основных причин прерывания беременности (преэклампсию), системные амилоидозы, некоторые формы онкологических заболеваний. Кроме того, в последние годы выявлен ряд функциональных амилоидов, способных выполнять свои биологические функции в амилоидной изоформе. Предполагается, что разнообразие амилоидов и амилоидогенных белков не ограничивается современными данными. В частности, с помощью биоинформатического алгоритма ArchCandy [1] нами был предсказан амилоидогенный потенциал у ряда транскрипционных факторов человека, вовлеченных при определенных условиях в онкогенез. В ходе данной работы мы проанализировали амилоидогенный потенциал исследуемых транскрипционных факторов *in vivo* при помощи флуоресцентной микроскопии и разработанной нами ранее дрожжевой тест-системы [2]. Для белков, показавших амилоидогенный потенциал в дрожжах, была проанализирована устойчивость к ионным детергентам [3]. Далее планируется исследовать амилоидные свойства белков *in vitro* и в культуре клеток человека (НЕК293Т), а также исследовать связь агрегации исследуемых белков с развитием онкологических заболеваний.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-14-0014, а также Санкт-Петербургского государственного университета (проект № 93025998).

Литература.

1. Ahmed A.B., Znassi N., Château M., Kajava A.V. A structure-based approach to predict predisposition to amyloidosis // *Alzheimer's & Dementia*. – 2015. – Vol. 11, No 6. P. 681-690.
2. Chernoff Y.O., Grizel A.V., Rubel A.A., Zelinsky A.A., Chandramowlishwaran P., Chernova T.A. Application of yeast to studying amyloid and prion diseases // *Advances In Genetics*. – 2020. – Vol 105, No 7. P. 308-314.
3. Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D., and Kushnirov, V.V. Yeast [PSI+] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol 278, No 49. P. 49636-49643.



ВЛИЯНИЕ G-КВАДРУПЛЕКСОВ ПРОМОТОРА ГЕНА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ
ТЕЛОМЕРАЗЫ ЧЕЛОВЕКА НА ФУНКЦИИ БЕЛКА MUTL
ИЗ СИСТЕМЫ РЕПАРАЦИИ «МИСМАТЧЕЙ»

Савицкая В.Ю.¹, Монахова М.В.², Сныга В.Г.¹, Кубарева Е.А.²

¹Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ФГБОУ ВО Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

svk1896@mail.ru

Возникновение онкологических заболеваний может быть вызвано повреждениями ДНК, которые в нормальной клетке устраняются с помощью различных систем репарации. Наиболее трудно репарируемые мутации в ДНК активируют апоптоз клетки, который регулируется множеством факторов, в их числе формирование G-квадруплексов в ДНК (G4). Известно, что промоторы онкогенов «обогащены» G-богатыми последовательностями, способными образовывать G4. Например, участок промотора гена обратной транскриптазы теломеразы человека (*hTERT*), формирующий 3 тандемных квадруплекса *in vitro*. Появление точечных мутаций в G4 данной последовательности приводит к развитию различных злокачественных опухолей, что может быть связано с нарушением узнавания этих мутаций системами репарации.

Объектом изучения являлась система репарации «мисматчей» в ДНК (MMR). MutL – один из ключевых белков MMR, который вносит одноцепочечный разрыв в «дочернюю» цепь ДНК после узнавания «мисматча» другим ферментом системы. Ранее взаимодействие G4 с гомологами MutL из разных организмов изучено не было. Целью данной работы являлось исследование взаимодействия MutL с одноцепочечным G-богатым участком промотора гена *hTERT*, формирующим G4.

В ходе работы использовали MutL и фактор процессивности ДНК-полимеразы III из *N. gonorrhoeae* (ngMutL и ng β , соответственно). ngMutL обладает схожим строением и функциями с эукариотическими гомологами, что позволяет применять результаты данного исследования для MMR человека. В качестве субстратов использовали нативные и мутантные последовательности *hTERT*, содержащие нуклеотидные замены G228A, G250A и двойную замену G242A/G243A.

Мы впервые показали, что связывание ngMutL с G4 характеризуется существенно большим сродством (с константой диссоциации 80 нМ), чем с двуцепочечной ДНК той же длины (250 нМ). Введение мутаций в G4 последовательности *hTERT* не оказывало существенного влияния на комплексообразование с ngMutL. Впервые проведен гидролиз линейных субстратов *hTERT* ngMutL и показано изменение «паттерна» расщепления по сравнению с гидролизом ДНК, не содержащей G4. Показано, что ngMutL расщепляет *hTERT* в промежутках между G4, но не внутри квадруплексных мотивов. Тем не менее, мутации в *hTERT* существенным образом не влияли на функции ngMutL. Таким образом, образование G4 в промоторе *hTERT* может препятствовать внесению одноцепочечного разрыва белком MutL, тем самым подавляя MMR.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 21-14-00161).



НОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ ТЕЛОМЕР У *PHYSCOMITRIUM PATENS*

Санникова А.В.¹, Шарипова М.Р.¹, Шакиров Е.В.^{1,2}, Валеева Л.Р.¹

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия;

²Department of Biological Sciences, College of Science, Marshall University, Huntington, USA

anastasya.sannikova@bk.ru

Теломеры представляют собой нуклео-протеиновые комплексы, составляющие концевые участки линейных хромосом эукариот. Они помогают сохранять целостность генома, обеспечивая две важнейшие функции: защиту ДНК при неполной репликации и защиту от сквозных слияний хромосом, а также действия экзонуклеаз. Последовательность теломер консервативна, однако вариабельность длины теломер возможна даже в пределах одного вида, что указывает на различия в регуляторных механизмах. Наиболее малоизученной областью остается биология теломер растений. Эффективной модельной системой для изучения вопросов эволюции и регуляции биологии теломер у растений может стать бриофит *Physcomitrium patens*. Филогенетическое расположение, малые размеры и разработанные методы позволяют использовать *P. patens* в изучении молекулярно-генетических, биохимических и физиологических аспектов развития растений, связанных с теломерами.

Целью работы было провести сравнительный анализ длины теломер в различных экотипах *P. patens*, а именно, экотипах: Gransden (Великобритания), Reute (Германия), Kaskaskia (США), Villersexel (Франция). Для анализа длины теломер использовали ДНК, выделенную из тканей 14-дневной протонемы *P. patens*. Анализ длины теломер проводили методом TRF (Terminal Restriction Fragment analysis) совместно с Саузерн-блот анализом. Расчет средней длины теломер проводили с помощью программы TeloTool. Нами было показано, что разные экотипы растений *P. patens* имеют длину теломер в диапазоне от 1000 до 1500 п.о., что в 1.5-3 раза короче по сравнению с теломерами модельного покрытосемянного растения *Arabidopsis thaliana*, длина теломер которого в среднем составляет от 2500 до 4500 п.о. Так, средняя длина теломер у экотипа Gransden составила 1324 п.о., длина теломер у экотипа Reute составила 1369 п.о., у экотипа Villersexel 1369 п.о. и длина теломер у экотипа Kaskaskia составила 1202 п.о. Помимо этого, мы показали, что у всех исследованных экотипов присутствуют специфические теломерные последовательности, предположительно внутривнутрихромосомной локализации, причем не совпадающие у всех экотипов.

Таким образом мы показали, что длина теломер у *P. patens* остается неизменной внутри вида. *P. patens* обладает более короткими теломерами по сравнению с покрытосеменными. Дальнейшее исследование биологии теломер бриофитов позволит получить новые данные об эволюции механизмов регуляции длины теломер и их функциональной активности у наземных растений.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-14-00147.



ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОД
(CRUSTACEA: AMPHIPODA) *EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS* (GERSTF., 1858)
В РЕКЕ АНГАРЕ

Саранчина А.Е.¹, Дроздова П.Б.^{1,2}, Ржечицкий Я.А.¹, Мутин А.Д.¹, Тимофеев М.А.^{1,2}

¹НИИ биологии, ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия;

²АНО Байкальский исследовательский центр, Иркутск, Россия

alexandra147801@gmail.com

Бассейн озера Байкал является точкой активного видообразования многих таксономических групп, в частности – амфипод. Уже насчитывается более 350 видов и подвидов, и с каждым годом это число только растёт. *Eulimnogammarus verrucosus* – распространённый вид в бассейне Байкала и популярный модельный объект для исследований. Однако только спустя 150 лет после открытия вида было обнаружено, что он образует три филогенетических группы (западная, южная и восточная), различающихся по последовательности маркерного гена первой субъединицы цитохром с-оксидазы (COI).

Ангара – единственная река, вытекающая из Байкала. В неё могут проникать представители двух групп, западной и южной, ареалы обитания которых отстоят на расстояние около 1 км у истока реки. На протяжении Ангары располагаются два моста, которые могут связывать популяции с разных берегов и плотина, создающая барьер для распространения. Изучение генетического происхождения вида в этом регионе даст понять, как представители ранее разделённых популяций одного вида взаимодействуют друг с другом.

Цель исследования: определить происхождение популяций *Eulimnogammarus verrucosus*, обитающих в разных участках реки Ангары, с помощью анализа последовательностей COI.

Были отобраны по четыре животных, схожих с *E. verrucosus*, с четырех разных точек: перед плотиной на правом и левом берегу и после второго, самого дальнего от истока, моста на правом и левом берегу. Для ПЦР использовали известные последовательности праймеров. Секвенирование производили по методу Сэнгера. В качестве референсной последовательности использовали последовательность COI представителя западной группы *E. verrucosus*. Выравнивание производили в программе UGENE. Генетическая сеть построена в программе SplitsTree5. В качестве внешней группы выбран вид *E. vittatus*. Также в анализ были включены последовательности всех трех филогенетических групп. Согласно полученным данным, к южной кладе относятся все особи, собранные с правого и левого берега за мостом, а также две особи с левого берега до плотины. Две особи с левого берега, а также три особи с правого берега до плотины, выделяются в обособленную группу. Представителей западной клады в выборке не обнаружено. Исходя из этого, можно сделать следующие выводы: в реке Ангара происходит распределение амфипод южной группы по двум берегам; в истоке реки обитает обособленная от байкальских морфа *E. verrucosus*. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 20-64-46003.



СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕЦЕПТОРА КЛАССА GPCR,
АССОЦИИРОВАННОГО С ПАТОГЕНЕЗОМ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Сафронова Н.А.¹, Сухачёва О.А.¹, Мишин А.В.¹, Черезов В.Г.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия;

²Университет Южной Калифорнии, Лос-Анджелес, США

safronova.na@list.ru

Рецепторы, сопряженные с G белком (англ. G protein-coupled receptors, сокр. GPCR) – большое семейство, включающее в себя около 800 белков. Эти рецепторы вовлечены в огромное количество процессов: зрение, вкус, обоняние, эмбриональное развитие и т.п. GPCR связываются с самыми разными лигандами – от малых молекул до пептидов и белков – и являются важными мишенями для лекарственных препаратов: до 40% лекарств на рынке нацелены на рецепторы класса GPCR.

В данной работе исследуется один из рецепторов GPCR. Этот рецептор играет важную роль в развитии ЦНС, в частности, является регулятором формирования миелиновой оболочки нейронов. Рецептор экспрессируется в клетках-предшественниках олигодендроцитов (англ. Oligodendrocyte precursor cells, OPC) строго на определенной стадии их развития; экспрессия рецептора прекращается одновременно с началом формирования миелина. Искусственно созданная устойчивая экспрессия рассматриваемого рецептора у мышей приводит к нарушению формирования миелина и к симптомам, схожим с симптомами рассеянного склероза. Рассматриваемый рецептор также экспрессируется при повреждениях ЦНС. В окрестностях повреждения он появляется в пораженных нейронах, в клетках микроглии, а спустя некоторое время – и в OPC, которые участвуют в восстановлении данного участка ЦНС.

Всё вышесказанное делает описываемый рецептор привлекательной мишенью для разработки новых препаратов, в частности, для терапии при рассеянном склерозе и других заболеваниях, сопровождающихся повреждениями миелина. Особенно актуальна задача поиска селективных и эффективных ингибиторов для этого рецептора, обладающих минимальными побочными эффектами. Структура рецептора высокого разрешения поможет решить эту задачу. Для получения структуры рецептора необходимо наладить гетерологичную экспрессию, чтобы наработать рецептор в достаточных количествах, а также добиться того, чтобы очищенный белок был достаточно стабильным и мономерным.

В данной работе мы создали генно-инженерную конструкцию рецептора для экспрессии в клетках *Sf9*. Протокол выделения и очистки были оптимизированы для получения наибольшего выхода белка и его наилучшей стабильности. В итоге был получен мономерный образец рецептора в мицеллах, проведены попытки кристаллизации. Также был получен мономерный комплекс рецептора с G белками для исследований методом криоэлектронной микроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021.



РАЗРАБОТКА ЛОГИЧЕСКОГО ВЕНТИЛЯ «INHIBIT GATE» НА ОСНОВЕ БИНАРНОГО ДЕЗОКСИРИБОЗИМА

**Смирнов В.В.¹, Дрозд В.С.¹, Лаушкина В.О.¹, Васильева Т.В.¹, Кальнин А.Ю.¹,
Эльдиб А.А.¹, Колпашиков Д.М.²**

¹ФГАОУ ВО Национальный исследовательский институт ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

²Университет центральной Флориды, Орlando, США

v_smirnov@scamt-itmo.ru

Введение. Нуклеиновые кислоты (НК) являются привлекательным материалом для наноинженерии, которые позволяют создавать функциональные конструкции в наномасштабах.

Развитие ДНК-компьютеров вызвано двумя лимитирующими факторами у электронных устройств: (i) размер электронных устройств зависит от микросхем; (ii) электронные устройства не могут работать в специфических условиях (внутриклеточной среде, с синтетическими молекулами). ДНК-компьютеры способны преодолеть эти факторы, из-за их органической природы, гибкости в проектировании и наноразмерного масштаба.

В данном исследовании были разработаны ДНК-конструкции, которые проявляют каталитическую активность для гидролиза субстрата (целевой РНК) с микроРНК-зависимым механизмом. Они работают как логические вентили (ДНК-вентили). В данной работе мы опишем «INHIBIT gate».

Основная часть. Поведение ДНК-вентилей удобно описывать с помощью логических выражений. Например, для «INHIBIT gate» справедлива функция: $Y=A \cdot \neg B$. Где: Y – проявление или отсутствие каталитической активности (1 или 0); Соответствующие значения для A – «активирующая» микроРНК и B – «супрессорная» микроРНК. Выражение для «INHIBIT gate – каталитическая активность может быть только при присутствии «активирующей» микроРНК (Если $A=1$ и $B=0$). Добавление же «супрессорной» микроРНК подавляет эту каталитическую активность ($B=1$).»

В проектировании была реализована идея переключения, реагирующий на микроРНК, на основе механизма рибопереклюателей.

Для понимания взаимодействия «INHIBIT gate» с микроРНК, использовался метод гель электрофореза для всех комбинаций микроРНК. В результате доказано, что «INHIBIT gate» действует по вышеописанному механизму.

Каталитическая активность устанавливалась по гидролизу субстрата, а степень расщепления измерялась флуоресцентным анализом.

Уровень расщепления субстрата за один час инкубации составил $88.2\% \pm 6.1\%$. Также удалось достигнуть подавления каталитической активности до фонового значения – $15.1\% \pm 2.4\%$ при добавлении «супрессорной» микроРНК в соотношении 3:1 к «активирующей» микроРНК.

Заключение. Полученные результаты могут быть использованы для разработки ДНК-компьютера, который содержит комбинацию ДНК-вентилей. Такое устройство уже способно детектировать различные олигонуклеотиды в растворе.

Мы считаем, что разработка ДНК-компьютеров имеет перспективы не только для альтернативных вычислений фундаментальных задач, но и для задач диагностики и терапии, так как нуклеиновые кислоты тесно связаны с генетическими заболеваниями.



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ УЧАСТИЯ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2 В РЕГУЛЯЦИИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

Смирнова Д.В.^{1,2}, Костина Д.А.¹, Лобов А.А.¹, Карелкин В.В.³, Малашичева А.Б.¹

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГАОУ ВО Национальный исследовательский институт ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии
имени Р.Р. Вредена Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

d_snirnova@scamt-itmo.ru

Runx2 является ключевым регулятором остеогенной дифференцировки как при нормальной кальцификации и дифференцировке остеобластов, так и при патологической кальцификации, в частности, сосудов и клапанов сердца. Runx2 имеет множество генов-мишеней, а его экспрессия в свою очередь зависит от активности других сигнальных путей. Runx2 является звеном многих сигнальных каскадов, таких как Wnt, Notch, Sox9, Msx2, и сигнальный путь Hedgehog (Rutkovskiy, Stenslökken, и Vaage 2016).

Особый интерес вызывает взаимодействие сигнальных путей Runx2 и Notch. Молекулярные механизмы взаимовлияния сигнального пути Notch на Runx2 и механизмы его взаимодействия с другими сигнальными каскадами неизвестны. Runx2, по-видимому, не является прямой мишенью сигнального пути Notch, как это описано в ранних работах по изучению взаимодействия Notch и Runx2 (Garg et al., 2005), и в литературе практически не описано механизмов, за счет которых сигнальный путь Notch может регулировать его экспрессию (Hilton et al., 2008; Engin et al., 2008). В то же время известно, что как Runx2, так и сигнальный путь Notch влияют на остеогенную дифференцировку клеток. Остается неясным какую роль играет взаимодействие Runx2 и Notch в процессах минерализации и остеогенной дифференцировки клеток и может ли Runx2 влиять на активность сигнального пути Notch.

Целью работы являлось выяснить повлияют ли изменения в уровне продукции клетками Runx2 на активность сигнального пути Notch и будет ли этот эффект зависеть от типа клеток и условий культивирования. С помощью лентивирусной трансдукции мы активировали либо подавляли продукцию Runx2 в первичных клетках остеобластов человека, для которых свойственна экспрессия Runx2 и в эндотелиальных клетках пуповинной вены человека, которые в норме не экспрессируют Runx2. Влияние Runx2 на сигнальный путь Notch оценивали методом ПЦР в реальном времени по уровню экспрессии генов-компоненты сигнального пути Notch.

По результатам исследования было показано, что при повышении остеобластами продукции Runx2 происходит стимуляция их остеогенных свойств, а также повышается уровень транскрипции *HEY1*, прямой мишени сигнального пути Notch, в то время как в эндотелиальных клетках мы наблюдали снижение активности сигнального пути Notch в ответ на активацию продукции Runx2. Таким образом, мы показали, что Runx2 способен модулировать активность сигнального пути Notch.

Исследование выполняется при финансовой поддержке РФФ, проект № 18-14-00152п.



ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ФАКТОРА CHD1 В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ
ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНОВ В СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ В ХОДЕ РАЗВИТИЯ
D. MELANOGASTER

Торошина А.В., Конев А.Ю., Ильина Ю.А.

ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ
«Курчатовский институт», Гатчина, Россия

toroshchina_av@pnpi.nrcki.ru

CHD1 (*Chromodomain-Helicase DNA-binding 1*) – это консервативный АТФ-зависимый хроматин-ремоделирующий фактор. Хроматин-ремоделирующие факторы необходимы для преобразований хроматина в процессах реализации генетической информации. Для белка CHD1 дрозофилы впервые было показано участие не только в ремоделировании, но и в сборке хроматина *in vivo*... Гомологи фактора CHD1 у человека (CHD1 и CHD2) играют существенную роль в онкогенезе и развитии эпилепсии.

Сверх-продукция в клетке хроматин-ремоделирующих белков дикого типа и форм белков с нарушенной АТФ-азной активностью часто используется для исследования их функций и механизма действия. Ранее нами показано, что сверхэкспрессия в клетках слюнных желез личинок дрозофилы как нативной, так и каталитически неактивной форм белка CHD1 приводит к деформации и деконденсации определенных участков политенных хромосом, с которыми связываются CHD1 и РНК-полимераза II. Изменения морфологии хромосом при сверх-экспрессии отличаются от эффекта нуль-мутаций *Chd1*, где укорочение хромосомы и нарушение дисковой структуры наблюдается только для X-хромосомы самцов.

В данной работе с помощью ОТ-ПЦР мы проанализировали влияние сверхэкспрессии трансгенов *Chd1*, а также нуль-мутаций по этому гену на экспрессию ряда специфических для слюнных желез генов, резко изменяющих уровень транскрипции в ходе развития (*Sgs4*, *Sgs5*, *ng2*, *ng3*, *Pig1* и *Eig71*). Все они расположены в участках хромосом аномально деконденсированных при сверх – экспрессии трансгенов. Мы показали, что особи со сверх - продукцией как белка CHD1 дикого типа, так и его каталитически неактивной формы проявляют достоверные отклонения от особей дикого типа в уровне экспрессии исследованных генов и динамике ее изменений в ходе развития. Для исследованных генов наблюдается сходный характер изменений транскрипции при сверх – продукции обеих форм белка, который не совпадает с эффектами нуль-мутаций *Chd1*. Таким образом, влияние сверх-экспрессии трансгенов *Chd1* и на структуру хромосом, и на транскрипцию исследованных генов связано с высокой концентрацией белка в клетке, а не его каталитической активностью.



АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ОПЕРОНА *SRFA* ПОСРЕДСТВОМ 6S-1 РНК В КЛЕТКАХ *BACILLUS SUBTILIS*

Трефилов В.С.¹, Елкина Д.А.¹, Буренина О.Ю.², Хартманн Р.К.³, Кубарева Е.А.¹

¹Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²АНОО ВО Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Россия;

³Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Марбург, Германия; НИИ
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ФГБОУ ВО Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

trefilov.vadik@gmail.com

6S РНК – малая некодирующая РНК, присутствие которой предсказано в более чем 1600 бактериях. 6S РНК играет роль глобального регулятора транскрипции за счет своей консервативной вторичной структуры, напоминающей ДНК в открытом комплексе с РНК-полимеразой. В клетках *Bacillus subtilis* закодированы две 6S РНК: 6S-1 и 6S-2. 6S-1 РНК обладает большинством отличительных черт, характерных для 6S РНК как класса некодирующих РНК [1], поэтому она стала объектом исследования в данной работе.

В процессе работы мы исследовали влияние нокаута гена 6S-1 РНК (*bsrA*) на транскрипцию 8 генов: *srfAA*, *ppsB*, *nadD*, *pstBA*, *pabC*, *holB*, *gidA*, *pbpB*. Для оценки уровня транскрипции генов методом ОТ-кПЦР были определены относительные количества мРНК в клетках дикого типа и в клетках с нокаутом гена 6S-1 РНК ($\Delta bsrA$, ΔA). Показано, что в поздней стационарной фазе нокаут гена 6S-1 РНК достоверно приводит к повышению количества мРНК генов *gidA*, *pabC*, *holB* и *srfAA* в 3-5 раз. Также была промоделирована стадия выхода из стационарной фазы роста клеток. При анализе уровня транскрипции в отобранных из этой фазы клетках наибольшая разница в количестве мРНК наблюдалась для гена *srfAA* (в 1,5 раза). Мы решили уделить больше внимания гену *srfAA* и содержащему его оперону *srfA*, отвечающему за нерибосомальный синтез мощнейшего биосурфактанта сурфактина [2]. Было показано, что нокаут гена 6S-1 РНК увеличивает эффективность транскрипции как всего оперона *srfA*, так и его активаторов *comA* и *perR* в стационарной фазе роста, причем наиболее существенно повышается транскрипция гена *perR* (примерно в 8 раз). Исходя из этого можно предположить, что активация оперона *srfA* обусловлена именно положительной регуляцией 6S-1 РНК транскрипции гена *perR*.

Таким образом, впервые в клетках *B. subtilis* обнаружен ген *srfAA*, транскрипция которого регулируется 6S-1 РНК в стационарной фазе роста клеток и на выходе из нее. Также впервые было показано влияние 6S-1 РНК на оперон *srfA* и его активаторы. Липопептидный биосурфактант сурфактин, за биосинтез которого отвечает оперон *srfA*, обладает антибактериальными, противовирусными и противогрибковыми свойствами, а также используется в ряде промышленных областей, таких как косметология, пищевая промышленность, медицина и тд. Полученный результат может стать основой для создания новых штаммов-суперпродуцентов сурфактина, которые позволят снизить стоимость сурфактина и повысить его доступность.

Литература.

1. Steuten B. et. al. Regulation of transcription by 6S RNAs//RNA. 2014. Т. 11. № 5. С. 508-521.
2. Wu Q. al. Systematically engineering the biosynthesis//Metabolic engineering. 2019. Т. 52. С. 87-97.



МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА
BEAUVERIA BASSIANA С ВЫДЕЛЕНИЕМ ГЕНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ
НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЕГО РАЗВИТИЯ

Чемезова А.А.

МБОУ г. Иркутска средняя общеобразовательная школа № 24, Иркутск, Россия

chemezova_2006@mail.ru

Среди природных ресурсов снижения численности насекомых-фитофагов, повреждающих хвойные леса, особого внимания заслуживают энтомопатогенные грибы вида *Beauveria bassiana*. Грибы обитают в телах насекомых, в почве, на растениях. Периодически эти энтомопатогенные грибы вызывают вспышки массовых заболеваний насекомых (пандемии), что приводит к резкому снижению их численности. Однако возникновение эпизоотий в большой степени зависит от многих факторов внешней среды и случается довольно редко для подавления численности сибирского шелкопряда. *Beauveria bassiana* поражает широкий круг чешуекрылых, жесткокрылых, полужесткокрылых, прямокрылых и перепончатокрылых насекомых, а также некоторые виды клещей. Поэтому выбрали для изучения именно этот энтомопатогенный грибок.

Цель исследования – молекулярно-генетическое изучение энтомопатогенного гриба для разработки нового биоинсектицида.

Задачи исследования.

Выделить энтомопатогенный грибок и произвести посев в чашки Петри для получения чистой культуры.

Исследовать пригодность двух генов (*18S pPHK* и *EF-1a*) для молекулярно-генетической идентификации гриба.

Определить видовую принадлежность гриба путем анализа гомологии полученных фрагментов генов в международной базе данных *GenBank*.

Построить филогенетическое дерево.

Выявить основные гены, влияющие на вирулентность.

В работе изучается энтомопатогенный грибок *Beauveria bassiana* с использованием морфологического и молекулярно-генетического методов. Для проведения морфологического определения вида энтомопатогенного гриба была получена чистая культура. С помощью определителя энтомопатогенных грибов произвели определение как *Beauveria bassiana*.

На втором этапе из чистой культуры гриба выделили ДНК, провели ПЦР и секвенирование фрагмента гена *18S pPHK* и *EF-1a pPHK*.

С помощью программы BioEdit визуализировали данные и провели поиск в базе данных *GenBank*, используя Nucleotide BLAST, в результате чего показали наибольшую гомологию (100%) с видом *Beauveria bassiana*.

Построено филогенетическое дерево байесовским методом с использованием программы MrBayes и визуализировано с помощью программы *FigTree*. На построенном филогенетическом дереве анализируемая последовательность кластеризуется с последовательностью вида *Beauveria bassiana*.

На основе анализа публикаций выделили основные гены, влияющие на вирулентность энтомопатогенного гриба на всех стадиях его развития.



ИНДУКЦИЯ ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СЫВОРОТОЧНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А В УСЛОВИЯХ КИСЛОГО pH НЕ ВЛИЯЕТ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Чурина Т.С., Раззорова Е.А., Горшкова Е.Н.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

tchurina.ttn@yandex.ru

Бактерицидный потенциал нейтрофилов, помимо реализации первой линии защиты организма от инфекционных агентов, может приводить к повреждению тканей в условиях неконтролируемого воспаления. Одним из эффективных способов регуляции как численности нейтрофилов в местах воспаления, так и их активности является своевременный запуск их гибели по пути апоптоза, что предотвращает высвобождение гистотоксического содержимого их гранул. В качестве иммуномодуляторов сегодня все чаще применяются препараты иммуноглобулина для внутривенного введения, индуцирующие гибель иммунных клеток входящими в состав препарата функциональными антителами против CD95, молекул Siglec-8 и -9, а также за счет специфичного взаимодействия Fc-фрагмента иммуноглобулинов с их Fc-рецептором.

Нейтрофилы человека конститутивно экспрессируют на своей поверхности FcαRI – рецептор к IgA, в то же время содержание IgA в некоторых иммуноглобулиновых комплексных препаратах может достигать 25%. Все это делает IgA перспективным объектом для изучения в качестве терапевтического иммуномодулятора. Ранее нами было показано, что обработка IgA кислыми буферными растворами приводит к приобретению им полиспецифических свойств, и, как следствие, связывать больший спектр антигенных структур. В связи с чем целью настоящей работы стала оценка способности кислых буферных растворов сообщать новые иммунорегуляторные свойства сывороточному IgA.

В работе был использован сывороточный IgA человека в составе иммуноглобулинового комплексного препарата («НПО «Микроген», Россия), очищенный в нейтральном диапазоне pH (pH 7,2-7,4). IgA модифицировали кратковременной инкубацией в буферном растворе с pH 2,6 и последующим его переводом в нейтральную среду (pH 7,4). Влияние pH-модифицированного IgA на жизнеспособность нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии для нестимулированных и стимулированных медиаторами воспаления (100 нг/мл LPS, 25 нг/мл TNF-α) клеток, выделенных из периферической крови здоровых по медицинским показателям доноров. Процент клеточной гибели в популяции фиксировали по уровню Annexin V-FITC- и пропидий йодид-положительно окрашенным клеткам.

В результате работы нами было показано отсутствие статистически значимых различий между уровнем апоптотической гибели как стимулированных, так и нестимулированных нейтрофилов, инкубированных с нативным и pH-модифицированным IgA, на протяжении всего времени эксперимента (25 часов).



ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ МНОЖЕСТВЕННОСТЬ МИКРОРНК В РЕГУЛЯЦИИ ПРОФИЛЕЙ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

Шемякин Г.М.¹, Глазко В.И.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет
– МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия;

²ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства
имени В.А. Афанасьева, пос. Родники, Россия

georgy.shemyakin@gmail.com

Исследования эпигенетической изменчивости последних лет уделяют особое внимание миРНК, так как эти молекулы обеспечивают посттранскрипционный контроль экспрессии генов и тем самым обеспечивают более тонкий контроль этого процесса. Обнаружилось, что часть миРНК, существующих в базе данных miRBase не являются субстратами DROSHA *in vitro* (Alles et al., 2019). В связи с этим возросла важность рассмотрения биохимической основы для выбора миРНК. Так, внимания удостоился процесс мишень-ориентированной деградации микроРНК (TDMD). В ходе данного процесса при высококомплиментарном спаривании миРНК и мРНК происходит процесс распада первых. Однозначного ответа на вопрос о механизме и о причинах этого процесса нет. Тем не менее появляются статьи, изучающие этот вопрос, например, было доказано, что убивиктинлигаза, содержащая адаптер субстрата ZSWIM8 опосредует TDMD (Han et al., 2020).

Индукцирующие TDMD взаимодействия миРНК с мишенью происходят не только за счет комплементарности 5' концов, но и 3' концов миРНК, а также центральными несоответствиями. Это обширное спаривание обнажает 3' конец миРНК, обычно погруженный в PAZ домен AGO (Sheu-Gruttadauria J et al., 2019). Подвергающийся воздействию растворителя 3' конец миРНК так же подвержен действию процесса, называемого tailing and trimming, в котором терминальные нуклеотидилтрансферазы добавляют нематричные нуклеотиды, а экзонуклеазы удаляют 3' концевые нуклеотиды. Относительно участия этих процессов в TDMD нет единого мнения. Биохимическая природа этих процессов до сих пор до конца не изучена. В то же время исследование TDMD, опосредованного комплексом убивиктинлигазы ZSWIM8 показывает, что рекрутирование этого фактора способно приводить к усиленному распознаванию и/или убивиктированию ассоциированного комплекса, содержащего миРНК.

Литература.

1. Alles J., Fehlmann T., Fischer U., Backes C., Galata V., Minet M., Hart M., Abu-Halima M., Grasser F.A., Lenhof H.P. et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47:3353–3364.
2. Han J., LaVigne C.A., Jones B.T., Zhang H., Gillett F., Mendell J.T. A ubiquitin ligase mediates target-directed microRNA decay independently of tailing and trimming. *Science*. 2020;
3. Sheu-Gruttadauria J et al., Structural Basis for Target-Directed MicroRNA Degradation. *Mol Cell* 75, 1243–1255 (2019).



ВЛИЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА SFPQ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ И ИНТЕГРАЗЫ ВИЧ-1

Шехтман С.П.

Химический факультет, ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

sssonnya@gmail.com

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов успешно применяется высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ), направленная на подавление активности основных вирусных ферментов. Несмотря на разнообразие мишеней ВААРТ, проблемой является развитие вирусом резистентности к используемым препаратам. Это происходит из-за неточной работы обратной транскриптазы ВИЧ-1, что приводит к быстрому появлению мутаций, вызывающих устойчивость к применяемым препаратам. Таким образом, актуальным является поиск и изучение новых мишеней для создания препаратов с минимальным риском развития устойчивости. Такими мишенями потенциально могут быть комплексы вирусных белков с клеточными белками, участвующими в репликации вируса.

Одним из клеточных белков-партнеров, участвующим в репликации ВИЧ-1, является белок SFPQ (Splicing factor, proline- and glutamine-rich). Он относится к семейству белков DBHS (*Drosophila behavior/human splicing*) и входит в состав ядерных телец параспеклей. Обладая доменами для взаимодействия с белками и нуклеиновыми кислотами, SFPQ участвует в регуляции сплайсинга, ответе на повреждения ДНК, регуляции транскрипции и других клеточных процессах. Существует ряд работ, в которых показано участие SFPQ в регуляции ранних стадий репликации ВИЧ-1, однако данные достаточно противоречивы, и пути такой регуляции остаются невыясненными. В нашей лаборатории было подтверждено, что SFPQ является положительным фактором обратной транскрипции и интеграции ВИЧ-1. Также известно, что SFPQ образует комплекс с интегразой ВИЧ-1, что может объяснить его участие в репликации вируса на стадии интеграции. Кроме того, известно, что обязательным условием успешной репликации вируса является формирование комплекса между обратной транскриптазой и интегразой. Таким образом, целью настоящей работы было исследовать взаимодействие SFPQ с обратной транскриптазой, а также оценить влияние SFPQ на формирование комплекса обратной транскриптазы и интегразы.

С использованием рекомбинантных белков методом соосаждения с последующим анализом Вестерн-блотом мы обнаружили, что SFPQ не взаимодействует с обратной транскриптазой ВИЧ-1. При этом SFPQ препятствует формированию комплекса интегразы с обратной транскриптазой. На основании этих данных можно предположить, что участие SFPQ в обратной транскрипции вируса может осуществляться посредством взаимодействия с интегразой, однако это требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-00437.



РОЛЬ PDCD4 В ТЕРМИНАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ ЭУКАРИОТ

**Шувалова Е.Ю.¹, Иванов А.В.^{1,2}, Теренин И.М.², Шувалов А.В.¹, Бизяев Н.С.¹,
Егорова Т.В.¹, Алкалаева Е.З.¹**

¹ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

²НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, ФГБОУ ВО Московский
государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Hritova_Katia@mail.ru

PDCD4 (programmed cell death protein) является опухолевым супрессором и многофункциональным регулятором в клетке. Снижение уровня его экспрессии нарушает функционирование клеток и может приводить к развитию раковых заболеваний. PDCD4 вовлечен в такие процессы, как пролиферация клеток, апоптоз, регуляция факторов транскрипции и биосинтез белка. Показано, что PDCD4 способен ингибировать трансляцию на этапе инициации и элонгации. Кроме того, он способен эффективно связывать поли(А)-связывающий белок (РАВР), который как было показано ранее в нашей лаборатории, участвует в терминации трансляции через взаимодействие с фактором терминации eRF3a. Взаимодействие с РАВР обусловило актуальность изучения возможного участия PDCD4 в терминации трансляции.

С помощью реконструированной системы трансляции мы показали, что PDCD4, независимо от РАВР, участвует в терминации трансляции, увеличивая её эффективность. Эксперименты по связыванию PDCD4 с рибосомными субъединицами из HeLa, а также с очищенными пре-терминационными комплексами (преТК) показали, что PDCD4 главным образом взаимодействует с 40S субъединицами рибосом, а также стимулирует связывание терминационных факторов с преТК. Кроме того, PDCD4 значительно увеличивает ГТФазную активность фактора терминации eRF3, что, как следствие, стимулирует диссоциацию eRF3 из пост-терминационного комплекса. В экспериментах по высвобождению пептида было показано, что PDCD4 способствует значительной стимуляции гидролиза пептидил-тРНК в присутствии как фактора eRF1, так и обоих факторов eRF1 и eRF3a. Таким образом, обнаружен интересный эффект: PDCD4, ингибирующий трансляцию на этапе инициации, существенно стимулирует терминацию трансляции.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-34-90048.

ПОЛУЧЕНИЕ МИНИМАЛЬНОГО ФРАГМЕНТА ACE2, СПОСОБНОГО СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАТЬСЯ С S-БЕЛКОМ КОРОНАВИРУСА

Яковлева Т.В.^{1,2}, Никонов С.В.², Никонова Е.Ю.²

¹ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия;

²ФГБУН Институт белка РАН, Пушчино, Россия

tatiana_yakovleva_00@mail.ru

Коронавирусные инфекции поражают как животных, так и людей; способны вызывать патологические процессы разнообразного клинического течения и разной степени тяжести, от бессимптомных и легких форм до крайне тяжелых форм; некоторые инфекционные формы



вызывают эпидемические и пандемические процессы. Коронавирусы – семейство вирусов, из которых в настоящее время 7 видов имеют медицинское значение, среди которых следует выделить 2 группы коронавирусов: группу классических коронавирусов человека (HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1, HCoV OC43) и группу особо опасных коронавирусов человека (SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2).

COVID-19 – опасное, эпидемическое инфекционное заболевание, вызванное инфицированием клеток организма одноцепочечным РНК-содержащим вирусом SARS-CoV-2, который обладает высокой степенью контагиозности и способностью развития нарушений функции систем органов с высокой вероятностью – острой дыхательной недостаточности, системного васкулита, острого респираторного дистресс-синдрома, полиорганных поражений и других тяжелых осложнений. Основным механизмом передачи коронавирусной инфекции – воздушно-капельный, при котором возбудители локализуются в слизистой оболочке дыхательных путей и переносятся в новый организм по воздуху.

Для проникновения в организм человека на поверхности вируса располагается S-белок, содержащий рецептор-связывающий домен (RBD) и мембрано-связывающий домен (RBM). Связывание RBD домена S-белка с ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2) является начальным этапом для проникновения SARS-CoV-2 в клетки мишени. Таким образом, детальное изучение взаимодействия RBD с ACE2 является важным этапом в борьбе с коронавирусной инфекцией. Целью этой работы было получение минимального фрагмента ACE2, способного специфически связываться с S-белком коронавируса. На данный момент нами определены границы минимального фрагмента ACE2, способного связывать S-белок коронавируса, и получена генетическая конструкция, несущая фрагмент гена ACE2 человека. В дальнейшем будет разработана схема выделения этого фрагмента и проверено его сродство к ACE2.



БИОХИМИЯ

УЧАСТИЕ КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОВОГО РЕЦЕПТОРА В РЕГУЛЯЦИИ P-ГЛИКОПРОТЕИНА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА *IN VITRO*

**Абаленихина Ю.В., Сеидкулиева А.А., Мыльников П.Ю.,
Шулькин А.В., Якушева Е.Н.**

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет
им. академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Рязань, Россия

abalenihina88@mail.ru

P-гликопротеин (Pgp, ABCB1) – эффлюксный АТФ-зависимый белок суперсемейства ABC-транспортеров. Экспрессия Pgp в опухолевых клетках является одной из причин развития их множественной лекарственной устойчивости, поэтому изучение механизмов регуляции белка-транспортера имеет важное практическое значение.

Цель исследования – определить роль конститутивного андростанового рецептора (CAR) в регуляции Pgp при воздействии пероксида водорода *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на клетках линии Сасо-2, гиперэкспрессирующих Pgp. Клетки инкубировали с H₂O₂ в концентрациях 0,1, 0,5, 1, 5, 10 мкМ в течение 24 и 72 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме прибавляли воду для инъекций (растворитель H₂O₂). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения, смена среды проводилась каждые 24 ч. При оценке механизма индукции Pgp под действием H₂O₂ в питательную среду за 30 мин до добавления прооксиданта вносили ингибитор CAR – 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1) в концентрации 10 мкМ. H₂O₂ использовали в концентрациях, которые вызывали повышение количества Pgp. Количество Pgp и CAR оценивали методом вестерн-блот. Полученные результаты обрабатывали дисперсионным анализом.

Результаты. H₂O₂ в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 мкМ и сроке воздействия 24 ч повышал содержание Pgp на 78,9%, 67,1% и 44,6% ($p < 0,05$), а при концентрациях 5, 10, 50 не оказывал эффекта ($p > 0,05$). При инкубации клеток Сасо-2 с H₂O₂ в течение 72 ч и концентрации 10 мкМ количество Pgp возрастало на 47,2%, а при 0,1, 0,5, 1 и 5 мкМ – не изменялось ($p > 0,05$). Воздействие H₂O₂ в концентрациях 0,1-50 мкМ не влияло на уровень CAR. Количество CAR статистически значимо повышалось относительно контрольных значений при концентрации H₂O₂ 10 мкМ и сроке инкубации 72 ч на 47,4% ($p < 0,05$) соответственно, а в концентрациях 0,1, 0,5, 1 и 5 мкМ – не изменялось. Ингибитор CAR CINPA 1 при длительности воздействия H₂O₂ 24 ч не подавлял воздействие прооксиданта в концентрациях 0,1, 0,5 и 1 мкМ, а при концентрации 10 мкМ и длительности воздействия 72 ч препятствовал повышению уровня Pgp.

Заключение. Таким образом, при воздействии H₂O₂ в концентрациях 0,1-1 мкМ и сроке инкубации 24 ч происходит индукция Pgp без участия CAR. Воздействие H₂O₂ в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч регулируется по CAR-опосредованному механизму.

Работа поддержана грантом Президента РФ МК-1856.2020.07.



МОДИФИКАЦИЯ СТРУКТУРЫ МОЛЕКУЛЫ ФИБРИНОГЕНА В РЕЗУЛЬТАТЕ ИНДУЦИРОВАННОГО СВОБОДНО–РАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ

**Азарова Д.Ю.^{1,2}, Васильева А.Д.², Юрина Л.В.², Гаврилина Е.С.², Индейкина М.И.^{1,2},
Бугрова А.Е.², Кононихин А.С.^{1,2}, Николаев Е.Н.^{1,3}, Розенфельд М.А.²**

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия;

²ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия;

³Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

azarovadana@mail.ru

Молекулы фибриногена (ФГ), циркулируя в плазме крови, постоянно подвергаются атаке активными формами кислорода (АФК). Известно, что ФГ является в 20 раз более чувствительным к окислительной модификации по сравнению с другими белками плазмы крови, а также является белком острой фазы для широкого ряда заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом. Посттрансляционные окислительные модификации фибриногена вызывают нарушение функциональных свойств белка и, как следствие, приводят к сборке фибрина с аномальной архитектурой, сниженной прочностью и эластичностью.

Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови человека. Свободнорадикальное окисление было индуцировано перекисью водорода и гипохлоритом, концентрация окислителя составляла 300 мкМ H₂O₂ и 50 мкМ HOCl. Методом масс-спектрометрии было обнаружено, что множество аминокислотных остатков, локализованных во всех трех полипептидных цепях и основных структурных элементах фибриногена, участвуют в окислении. Под воздействием H₂O₂ в молекуле фибриногена наиболее подверженными окислению оказались остатки метионина, триптофана и гистидина. При окислении фибриногена HOCl наиболее подверженными окислению оказались остатки метионина, тирозина, пролина. Такое расположение может быть связано с тем, что участие каждого остатка в окислительной модификации определяется не только его химической природой, но и зависит от пространственной доступности этой аминокислоты в белке. Модифицированные аминокислотные остатки были обнаружены во всех трех полипептидных цепях и всех структурных областях молекулы фибриногена, за исключением E области. Аминокислотные остатки, локализованные в области E, которые участвуют в связывании тромбина, не были подвержены окислительной модификации, что указывает на сохранение тромбинсвязывающих сайтов молекулы фибриногена при окислении. Содержащей наибольшее количество окислительных сайтов является C область (Met240, Trp276, Trp341, Trp391, Met476, Met517, His544, His545, Met584 (при окислении H₂O₂) и Met235, Met238, Ser255, Asn288, Ser432, Met476, Asp477, Met517, Glu526, Arg528, Tyr570 (при окислении HOCl)), что подтверждает гипотезу о возможности данной области служить ловушкой для молекул АФК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 21-74-00146. В работе использовалось оборудование ЦКП ИБХФ РАН.



ЭНДОГЕННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ И НАКОПЛЕНИЕ АММИАКА В МОЗГЕ – ОДИН ИЗ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВАЛЬПРОАТ-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Алилова Г.А., Тихонова Л.А., Косенко Е.А.

ФГБУН институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

hells2012@yandex.ru

Аммиак – нормальный клеточный метаболит, который постоянно образуется в тканях и регулирует многие жизненно важные процессы в организме. В норме его концентрация не превышает 50 мкМ. Это достигается путем его постоянной детоксикации в печени в цикле мочевины.

Всего лишь двукратное повышение концентрации аммиака в крови (гипераммониемия, ГА), особенно у детей, вызывает судороги, кому, которая часто заканчивается смертью, что свидетельствует о том, что аммиак является мощным нейротоксином.

ГА может возникать при острых и хронических болезнях печени, например, при гепатите и циррозе. Однако современные данные указывают на то, что ГА, возникающая на фоне нормальной детоксикационной функции печени, сопровождается многие другие патологии, такие как диабет, болезни почек, пересадка костного мозга, нейродегенеративные заболевания. Известна также медикаментозная ГА. Например, многочисленные побочные эффекты противосудорожного препарата вальпроата натрия (ВН) у детей с эпилепсией, сопровождающиеся развитием энцефалопатии, нарушением когнитивных функций и учащением судорог, часто сопряжены с ГА. При этом повышенная концентрация аммиака в крови у пациентов наблюдалась при нормальных «печеночных пробах», характеризующих целостность клеток печени.

Эти данные дают возможность предположить, что вальпроат-индуцированная энцефалопатия может быть связана с активацией эндогенных аммиак-образующих реакций, которые могут вносить самостоятельный вклад в развитие судорожных приступов независимо от концентрации аммиака в крови и его обезвреживания в печени.

С целью выявления эндогенных источников аммиака было изучено влияние ВН на активность ключевых ферментов обмена аммиака в митохондриях и цитозоле разных отделов мозга крыс.

Было обнаружено, что главными ферментами, участвующими в усиленном образовании и накоплении аммиака в мозге животных под воздействием ВН, являются митохондриальные глутаматдегидрогеназа и глутаминаза. Тогда как в цитозоле таким ферментом является аденозиндезаминаза.

Механизм возникновения вальпроат-индуцированной энцефалопатии в настоящее время неизвестен и требует дополнительных исследований.

Проведенные исследования помогут выявить не только новые механизмы токсического действия аммиака, но и создадут основу для обнаружения факторов риска энцефалопатии и развития судорог, возникающих на фоне нормальной детоксицирующей функции печени после приема ВН и других медикаментозных препаратов.



ВЛИЯНИЕ СВЕТА РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ДЕГИДРАТАЗЫ ДИГИДРОКСИКИСЛОТ

Анохина Г.Б., Автореева Е.Л., Оя П.С.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

dowi2009@mail.ru

Хорошо известно, что свет, как один из самых важных факторов окружающей среды, выполняет не только субстратную роль, но и осуществляет регуляторные функции в жизнедеятельности зелёного растения. В естественных условиях освещённость растения постоянно меняется как по интенсивности, так и по спектральному составу. Дегидратаза дегидроксикислот или оксидитрат дегидратаза (ОД, КФ 4.2.1.9.) фермент класса лиаз, который принимает участие в биосинтезе аминокислот, имеющие короткие разветвленные цепи. Дегидратаза дегидроксикислот участвует в превращении 2,3-дигидрокси-3-метилбутаноат в 3-метил-2-оксобутаноат, а также, ко всему прочему выполняющий взаимопревращение гидроксицитрата в 2-оксоглутарат. В геноме кукурузы в настоящий момент аннотированы два гена – *dhad-1* (LOC100273676, Gene ID: 100273676) и *dhad-2* (LOC100384514, Gene ID: 100384514).

Целью данной работы являлось исследование влияния света различного спектрального состава на функционирование дегидратазы дигидроксикислот в зеленых листьях кукурузы. В качестве объекта исследований выступали проростки кукурузы *Zea mays L.* сорта Воронежская -76, выращенные гидропонно. В качестве источника белого света использовались лампы дневного света, источниками красного и дальнего красного света служили светодиоды с областью испускания 640–680 нм и 710–750 нм. Синий свет получали с помощью светодиодов с областью испускания 465–470 нм. Интенсивность света составляла 0,044 Вт/м².

В ходе исследования влияния света различных длин волн на активность дегидратазы дигидроксикислот был установлен светозависимый характер функционирования данного фермента: на свету активность фермента в 10 раз ниже, чем в темноте. Облучение растений, находящихся в темноте, красным светом (КС) приводит к снижению общей ферментативной активности в два раза, в то время как облучение растений дальним красным светом (ДКС) увеличивает значения общей ферментативной активности почти в 1,6 раз. Исследования транскрипционной активности генов *ddha-1* и *ddha-2* показали, что облучение светом различных длин волн приводит к изменениям относительного уровня транскриптов обоих генов. Концентрация транскриптов гена *ddha-1* в растениях в темноте выше в 2,25 раза по сравнению со значениями на свету, в то время как значения относительного уровня транскриптов гена *ddha-2* в темноте были меньше, чем на свету в 0,7 раз. Величины транскриптов гена *ddha-2* после облучения растений ДКС и последовательном облучении КС и ДКС оставались ниже значений, отмеченных для варианта «свет», противоположная картина наблюдалась для относительного уровня транскриптов *ddha-1*.



ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ТКАНИ МОЗГА ЖИВОТНЫХ ПРИ ВОСПРОИЗВЕДЕНИИ МОДЕЛИ СПОРАДИЧЕСКОГО НДС

**Артыкбаева Г.М., Ишанходжаев Т.М., Ялалова И.Р., Мустафакулов М.,
Мамаджанов А., Саатов Т.С.**

Институт биофизики и биохимии при НУУз им. М. Улугбека, Ташкент, Узбекистан

gulnoraar@rambler.ru

За последние годы накоплены многочисленные свидетельства взаимосвязи болезни Альцгеймера (БА) и метаболических расстройств [Anjum I, Fayyaz M, Wajid A, et al., 2018]. Известно несколько исследований, посвященных содержанию и соотношению липидов в ткани мозга при моделировании нейродегенеративного состояния (НДС). Нарушение гомеостаза холестерина и фосфолипидов (ФЛ) в нервных клетках приводит к нарушениям синаптической пластичности, а уменьшение нейронального содержания фосфолипидов и холестерина и нарушение их динамики с помощью акцепторов приводит к нейродегенеративным изменениям в гиппокампе. Нами было воспроизведено НДС у животных с экспериментальной моделью метаболического синдрома (так называемый СД5 типа).

Целью работы было изучение спектра ФЛ в ткани мозга крыс с моделью спорадического НДС.

Материалы и методы. Экстракцию общих липидов из гомогената мозга крыс проводили по Фолчу. О количестве общих фосфолипидов и их отдельных фракций судили по содержанию фосфора, который определяли по методу, предложенному Васьковским. Количество фосфора отдельных фракций фосфолипидов измеряли после хроматографического разделения их наслоением на силикагель. Количество как общих, так и отдельных фракций фосфолипидов выражали в мкг липидного фосфора на грамм сухой ткани.

Результаты и обсуждение. При воспроизведении спорадической модели НДС СД5 обнаружено увеличение лизоформ фосфолипидов, фосфатидной кислоты и холестерина на фоне снижения содержания сфингомиелина (СМ), фосфотидилсерина (ФС), общего уровня фосфолипидов и некоторой тенденции в снижении ФИ и гликолипидов. Различия статистически значимы ($p < 0,05$). Наблюдаемое повышение лизоформ фосфолипидов и фосфатидных кислот указывает на активацию фосфолипаз при воспроизведении модели СД5, что, очевидно, влияет на ацетилхолиновые рецепторы клеток мозга и на нейропластичность нервных клеток в целом. Известно, что увеличение холестерина влияет на микровязкость мембран клеток и на образование агрегатов А β белка, что очевидно является важным фактором в возникновении инсулинорезистентности при воспроизведении модели НДС.



СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Бондарева И.Р., Селиванова Н.В.

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

irinabon2017@mail.ru

Сахарный диабет является болезнью сложного нарушения обмена веществ в организме, характеризующейся изменениями внутренних органов и систем. Фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ, КФ 1.1.1.27) широко экспрессируется в разных тканях организма и способен выделяться при их повреждении, за счет чего является индикатором данного процесса. Долгое время ЛДГ считался маркерным ферментом цитоплазмы, однако в последнее время появились довольно противоречивые сведения о присутствии данного энзима и в других фракциях клетки. В связи с этим целью данной работы стало изучение активности лактатдегидрогеназы в разных частях клетки печени здоровых крыс и животных с сахарным диабетом.

Для получения материала для исследования печени крыс (*Rattus norvegicus* линии Wistar), животных сначала усыпляли хлороформом, затем проводили декапитацию. Разделение цитоплазмы и митохондрий осуществляли с помощью дифференциального центрифугирования. Митохондрии разрушали осмотическим шоком в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH=7,8. В качестве исследуемых объектов был использован гомогенат, цитоплазма и митохондрии гепатоцитов печени крыс – здоровой (в качестве контроля) и больной сахарным диабетом. Активность лактатдегидрогеназы исследовали по скорости окисления NADH спектрофотометрически при длине волны $\lambda=340$ нм в кварцевых кюветах, используя коммерческий набор «ЛДГ-ВИТАЛ».

Спектрофотометрический анализ проб показал наличие активности исследуемого фермента во всех трех фракциях (гомогенат, цитоплазма, митохондрии). Уровень активности в клетках печени крыс больных сахарным диабетом был значительно ниже контрольной группы животных: в 3 раза в гомогенате, в 0,5 раз в цитоплазме, однако уровень активности в митохондриальной фракции наоборот был выше в 0,2 раза. Понижение уровня активности ЛДГ в гепатоцитах крыс, больных диабетом может быть обусловлено многочисленными механизмами, в том числе нарушением чувствительности рецепторов клеток к глюкозе. Из-за высокого накопления глюкозы в крови, и отсутствия ее в гепатоцитах, внутри клетки нарушаются процессы гликолиза, и активизируется глюконеогенез. В результате работы ферментов синтеза глюкозы не происходит образование субстрата – пировиноградной кислоты и как следствие не активизируется работа лактатдегидрогеназы. Таким образом, в гепатоцитах крыс в условиях сахарного диабета активность фермента лактатдегидрогеназы обнаруживается как в гомогенате, так и в цитоплазме и митохондриях.



НОВЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ ЦЕЛЛОБИОЗОДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Горина С.Ю., Гайдина А.С., Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.

ФГБУН институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушкино, Россия

sofya.gorina.1991@mail.ru

Целлобиозодегидрогеназа (CDH; EC1.1.99.18) – внеклеточная грибная оксидоредуктаза участвует в разложении древесины, окисляя целлобиозу и олигосахариды до d-лактонов с сопутствующим переносом электронов к литической полисахаридмонооксигеназе (LPMO). Благодаря своим свойствам CDH получила широкое применение как универсальный биодетекторный элемент в электрохимических биосенсорах и анодах в ферментативных биотопливных элементах и биосуперконденсаторах.

Согласно филогенетическому анализу генов, кодирующих CDH, целлобиозодегидрогеназы разделяют на несколько классов – I, II, III и IV. CDH I и CDH II различаются по структуре, каталитическим свойствам, субстратной специфичности, а также физико-химическим свойствам. CDH I представлены в основном среди базидиальных грибов, тогда как CDH II чаще находят у аскомицетов. Ни один из представителей CDH III и CDH IV еще не выделен и не охарактеризован. Однако, согласно филогенетическому анализу гены, кодирующие CDH III и CDH IV, в основном представлены среди аскомицетов. Их продукты могут значительно отличаться по структуре и свойствам, как между собой, так и по сравнению с CDH I и CDH II, что может расширить границы биотехнологического применения неисследованных ферментов вплоть до создания принципиально новых технологий.

Целью настоящей работы являлся скрининг новых аскомицетов – активных продуцентов CDH.

В ходе работы были отобраны новые штаммы аскомицетов, близкие к аскомицетам с известным геномом, содержащим гены CDH III. Осуществлена модификация ранее известного метода определения CDH-активности грибов при твердофазном культивировании на основе образования Берлинской лазури. Применение модифицированного метода детекции CDH-активности грибов позволила осуществить быстрый скрининг ростовых субстратов, при использовании которых в ходе культивирования отобранных грибов осуществляется продукция CDH. Исследована физиология продукции CDH активными аскомицетами и субстратная избирательность продуцируемых CDH.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-АНФФ № 21-54-14009.



УЧАСТИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ И ПРОАПОПТОТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В ПОВРЕЖДЕНИИ КЛЕТОК DRG ПОСЛЕ АКСОТОМИИ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА

Дзряян В.А.

ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Академия биологии и биотехнологии,
Ростов-на-Дону, Россия

dzreyan2016@mail.ru

Эпигенетическая регуляция повреждений периферических нервов в последние годы привлекает пристальное внимание исследователей. Но роль эпигенетических процессов в регуляции гибели и выживаемости клеток в первые часы после повреждения нервов пока не изучена. При действии неблагоприятных факторов HDACs I класса способны перемещаться из ядра в цитоплазму клеток, где они влияют на функцию разнообразных негистоновых белков путем их деацетилирования. Иммуноблоттинг показал, что в аксотомированных ганглиях дорзальных корешков спинного мозга крысы (DRG, dorsal root ganglia) наиболее ранние и специфичные изменения наблюдались со стороны гистондеацетилаз HDAC2 и HDAC3, экспрессия которых возрастала уже через 1 и 4 часа после перерезки седалищного нерва. Экспрессия фактора транскрипции E2F1 в аксотомированных нейронах DRG повышалась через 4 часа, активированной каспазы 3 и каспазы 6 – через 24 часа. Показано, что перерезка седалищного нерва вызывает транслокацию HDAC3 из цитоплазмы в ядро в первые 24 часа после аксотомии. Иммунофлуоресцентная микроскопия указывает на перераспределение E2F1 между ядром и цитоплазмой в аксотомированных нейронах DRG. Аксотомия седалищного нерва крыс вызывала достоверное снижение уровня Akt через 24 часа в цитоплазматической фракции клеток ганглиев. Наши данные свидетельствуют о вовлеченности HDAC2 и HDAC3, а также проапоптотических белков E2F1 и каспаз 3 и 6 в вызванное аксотомией повреждение клеток DRG. Полученные результаты об изменениях экспрессии исследуемых белков могут лечь в основу теоретической базы о механизмах нейродегенерации при аксотомии периферических нервов. Кроме того, данные белки могут служить в качестве потенциальных молекулярных мишеней при разработке нейропротекторов.

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 0852-2020-0028 и стипендии Президента Российской Федерации для молодых ученых.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЦЫПЛЯТ ПОСЛЕ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Колмакова К.Ю., Садовская Т.А., Азарнова Т.О.

ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Россия

kkolmakova1@gmail.com

В настоящее время особую актуальность приобрели вопросы повышения естественной резистентности сельскохозяйственных животных путем направленного воздействия экзогенными биологически-активными веществами на обменные процессы в различные



периоды онтогенеза. Эти вещества должны отвечать ряду требований: должны быть эффективными, экологически безопасными, экономически оправданными.

В работе была поставлена цель: изучить перспективы использования композиции высокоэффективных и безопасных стимуляторов эмбриогенеза цыплят, представленных «Рибав» в сочетании с янтарной кислотой и коламином при трансвариальной обработке инкубационных яиц аэрозольным способом для стимуляции эмбрионального и постэмбрионального развития цыплят.

Были сформированы опытная и контрольная группы яиц кур кросса «Шейвер белый», подобранные по принципу аналогов, с учетом времени снесения яиц, сроков хранения и массы. Возраст родительского стада составлял 250 дней, в каждую партию входило по 306 яиц. Яйца помещали в одинаковые инкубаторы. Яйца опытной группы обрабатывали комплексом: 0,1%-ного раствора коламина, 0,1%-ного раствора янтарной кислоты и 0,5%-ного раствора препарата «Рибав» аэрозольным способом перед закладкой в инкубатор и на 19-е сутки 0,1%-ного раствора коламина.

После использования комплекса биологически-активных веществ у цыплят в сыворотке крови было обнаружено повышение активности ферментов антиоксидантной защиты — пероксидазы в 1,8 раза и супероксиддисмутазы в 1,9 раза ($P < 0,001$), это свидетельствует о лучшей защите от окислительного стресса. Все вышеуказанные биохимические показатели не превышали референтных значений (верхней границы физиологической нормы). Кроме того, наблюдали снижение уровня метаболитов, представляющих опасность для цыплят: основания Шиффа ($P < 0,01$) в 2 раза и малонового диальдегида в 1,5 раза по сравнению с контролем.

В работе было показано, что растворы естественных метаболитов (коламина, янтарной кислоты и «Рибав») в оптимальных концентрациях профилактировали негативные последствия оксидативного стресса. Особенно они опасны в критические периоды развития эмбриона (поскольку изменяется интенсивность метаболических процессов, что сопровождается максимально интенсивными энергетическими затратами). Все это приводит к гипозенергетическим состояниям, что чаще всего является следствием «поломки» реакций митохондриальной цепи.

ДИНАМИКА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ИОННОГО СЕРЕБРА И СЕРЕБРА НАНОЧАСТИЦ (AGNP) В ОРГАНАХ МЫШЕЙ

Магазенкова Д.Н.

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО,
Санкт-Петербург, Россия

magdash@mail.ru

Благодаря своим уникальным свойствам AgNP находят широкое применение в диагностике, фармакологии и биотехнологиях. Однако динамика распределения серебра в организме млекопитающих остается не изученной. Целью данной работы является анализ распределения Ag между органами после однократной инъекции и при регулярном введении AgNP.



Метод введения был выбран на основании сравнения перорального, интраназального и интраперитонеального способов введения. В пульс-чейз опытах мышам линии С57В1/6 однократно внутрибрюшинно вводили Ag в концентрации 2,5 мг/кг в виде AgNP (сферической формы с диаметром около 40 нм по данным ТЭМ и Uv/vis 410 нм) или в виде нитрата серебра ($AgNO_3$). Через различные интервалы времени собирали образцы периферической крови, печени, легких, селезенки и почек. Для каждой временной точки было использовано не менее трех животных. Накопление Ag исследовали на мышах, которым в течение 5 дней вводили AgNP в концентрации 2 мг/кг. В полученных образцах измеряли концентрацию Ag и Cu методом ААС. В сыворотке крови прямым определением в геле измеряли оксидазную активность и содержание церулоплазмينا (ЦП) методом иммуноблотинга.

После однократной инъекции Ag обнаруживается в сыворотке крови через 5 мин и достигает максимума через 60 минут, при этом концентрация Ag из $AgNO_3$ в 2 раза выше, чем из AgNP. Содержание Ag остается постоянным в течение 4 часов для AgNP и в течение 2 часов для $AgNO_3$, после чего начинает снижаться. Концентрация Cu в крови в обоих случаях снижается через 2 часа после введения, что свидетельствует о появлении в крови ЦП с ионами Ag в активном центре. К 32 часам концентрация Cu в сыворотке падает в 2,5 раза. В тканях Ag накапливается неравномерно: наибольшую аккумулялирующую способность демонстрируют печень и селезенка, в то время как концентрации металла в легких и почках не превышают фоновые значения. Максимальная концентрация Ag в печени и селезенке достигается через 8 часов и 4 часа соответственно, при этом селезенка аккумулирует в 5 раз больше Ag из AgNP, чем из $AgNO_3$. Выведение Ag из органов начинается через 16 часов после инъекции. При ежедневном введении AgNP серебро накапливается в тканях, пока концентрация не достигает максимального значения, после которого перестает изменяться.

Таким образом, динамика распределения Ag в организме соответствует путям доставки Cu. При этом кинетика поступления Ag из AgNP и $AgNO_3$ в органы и его выведение различаются, Ag обоих включается в активные центры ЦП с разной скоростью.

Работа поддержана грантом РФФ 20-74-10087.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕМЯН СЕЛЬДЕРЕЙНЫХ КУЛЬТУР В ПИТАНИИ ЧЕЛОВЕКА В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА АНТИОКСИДАНТОВ И ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ

Молдован А.И., Харченко В.А., Голубкина Н.А.

ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства, п. ВНИИССОК, Россия

nastiamoldovan@mail.ru

В европейских странах семена моркови, пастернака, тмина и других культур из семейства Сельдерейные активно используются в питании человека. Семена добавляют в салаты, супы, мясные и овощные блюда. Благодаря высокому уровню антиоксидантов и водорастворимых белков семена сельдерейных культур очень полезны для людей, следящих за своим здоровьем, а также для вегетарианцев. Нами была дана характеристика антиоксидантной активности и водорастворимых белков 43 сортов 11 культур селекции ФГБНУ ФНЦО: анис, любисток, фенхель, кориандр, тмин, петрушка, сельдерей, укроп, морковь, пастернак, кервель. Общее содержание антиоксидантов снижается в ряду: любисток



> анис> петрушка > сельдерей > фенхель = укроп > кориандр > тмин > пастернак > морковь > кервель. Максимальное содержание фенольных соединений было зафиксировано в семенах любистка, аниса и фенхеля. Содержание водорастворимых белков в анисе, любистке, фенхеле и кориандре в три раза превысило средний уровень, фенольных соединений во всех изученных семенах культур семейства *Apiaceae*.

Результаты, полученные в данном исследовании, показали высокую питательную ценность семян сельдерейных культур и обуславливают перспективность использования семян в качестве пищевых добавок и натуральных пищевых консервантов.

Р53-ЗАВИСИМАЯ АКТИВАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ НЕРG2 ПРИ ДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ

Мумятова В.А., Сень В.Д., Балакина А.А., Терентьев А.А.

ФГБУН Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка, Россия

mumyatova@icp.ac.ru

Опухолевый супрессор р53 играет первостепенную роль в регуляцию ключевых клеточных процессов. Как транскрипционный фактор он контролирует экспрессию широкого ряда генов, в том числе регуляцию анти- и прооксидантных генов. Активные формы кислорода (АФК) входят в число основных причин канцерогенеза, при этом доказано, что опухолевые клетки характеризуются повышенным содержанием АФК, вызванным, в частности, дисфункцией антиоксидантной системы. Ограничения по применению современных противоопухолевых препаратов, в том числе и препаратов платиновой группы, также связано с нарушением про- и антиоксидантного баланса и накоплением АФК. Последние исследования показывают, что АФК и антиоксидантная система (АОС) принимают непосредственное участие в регуляции р53-зависимых реакций на действие ДНК-повреждающих агентов. В связи с этим, оценка редокс-статуса клетки, исследование АОС и ее регуляции имеет большой диагностический потенциал для терапии рака. В работе исследовались: комплекс двухвалентной платины – цисплатин, а также аминитроксильный комплекс платины, содержащий в своей структуре нитроксильный радикал, обладающий по своей природе антиоксидантными свойствами. Установлено, что оба комплекса вызывают накопление белка р53 в клетках НерG2, начиная с 6 часов воздействия, что сопровождается повышением экспрессии прямой мишени белка р53 – гена р21. При этом использование пифитрина как ингибитора функции белка р53 заметно снижает количество белка р53 и уровень экспрессии гена р21, что говорит о р53-зависимом механизме действия исследуемых веществ. С помощью флуоресцентной микроскопии установлено, что комплексы вызывают накопление и транслокацию белка р53 из цитоплазмы в ядро, а использование пифитрина её блокирует. Также установлено, что комплексы вызывают повышение уровня экспрессии генов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы через 12 часов, при этом подавление функции р53 приводит к снижению экспрессии генов АОС. Полученный результат, свидетельствует о р-53 зависимой активации антиоксидантной системы при действии комплексов платины в клетках НерG2.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, № АААА-А19-119092390041-5.



НОВЫЙ ЭНДОЛИЗИН МИОБАКТЕРИОФАГА З ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *AEROMONAS*

Мусаева А.А.^{1,2}, Чернышов С.В.¹, Микулинская Г.В.^{1,2}

¹ГНЦ ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. Шемякина и
Овчинникова РАН, Пушино, Россия;

²ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия

musaeva_ayajan@mail.ru

Эндолизин – литический фермент бактериофагов, обеспечивающий гидролиз пептидогликана клеточной стенки и выход фагового потомства на заключительной стадии развития фага. Эти белки обладают большим биотехнологическим потенциалом, поскольку являются перспективным антибактериальным средством. Будучи примененными к бактериям извне, они способны разрушать пептидогликан клеточной стенки и вызывать гибель бактерий вследствие осмотического лизиса.

В геноме бактериофага 3 (*Myoviridae*), инфицирующего бактерии рода *Aeromonas*, мы обнаружили белковую последовательность APU00465.1 длиной 135 аминокислот, проявляющую гомологию с эндолизинами группы L-аланил-D-глутаматпептидаз. Интересно, что гипотетический белок содержит неканоническую EF-подобную кальций-связывающую петлю, впервые обнаруженную у эндолизина бактериофага T5. Посредством синтеза гена на основе вектора pET28a была получена рекомбинантная плаزمид, содержащая искусственный ген, кодирующий природную белковую последовательность. С помощью трансформации в экспрессионный штамм, варьирования температуры культивирования и концентрации индуктора были подобраны условия для успешной продукции растворимого белка: штамм *E. coli* BL21(DE3), температура 20°C, индукция 0,05 мМ IPTG в течение 15 часов. Следует отметить, что температурный режим играет большую роль: при температуре 37°C целевой белок в клетках штамма-продуцента накапливается в виде тел включения.

Белок был очищен до электрофоретической гомогенности с помощью последовательных хроматографий на Toyopearl DEAE 650M и фосфоцеллюлозе. Выход по активности составил 13,7%, степень очистки – 4,9. Удельная литическая активность чистого препарата была количественно измерена спектрофотометрическим методом, основанным на убывании оптической плотности пермеабилizованных хлороформом клеток *E. coli*, и составила 4482±299 Е/мг белка.

Концентрация Tris-HCl буфера, оптимальная для работы фермента, лежит в диапазоне 25-50 мМ. рН оптимум исследовали как в Tris-HCl буфере, так и в глицин-NaOH буфере, и определили в области значений рН от 8,5 до 9,5.

Таким образом, на гомогенном препарате полученного рекомбинантного фермента было впервые показано, что гипотетический белок APU00465.1 – эндолизин, активный в отношении грамотрицательных микроорганизмов.



СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ, АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И СУММЫ ВОДОРАСТВОРИМЫХ АНТИОКСИДАНТОВ В ЛИСТЬЯХ КАПУСТЫ ПЕКИНСКОЙ И КАПУСТЫ КИТАЙСКОЙ

Плотников П.А., Молчанова А.В., Бондарева Л.Л.

ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства, п. ВНИИССОК, Россия

walle_19@mail.ru

Капуста пекинская (*Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr.) и китайская (*Brassica chinensis* L.) – салатные растения, относящиеся к семейству капустные, роду *Brassica*. Популярность этих капуст объясняется не только высокими вкусовыми качествами, но и пищевой ценностью, диетическими и лечебными свойствами, что важно в ранний весенне-летний период.

Целью наших исследований было изучить биохимические показатели (содержание аскорбиновой кислоты, суммы водорастворимых антиоксидантов и содержание полифенолов) листьев капусты пекинской (КП) сорт Гидра и капусты китайской (КК) сорт Веснянка, выращенных в условиях открытого и защищённого грунта Московской области. В результате исследований было выявлено, что наибольшее содержание аскорбиновой кислоты отмечено в листьях капусты пекинской сорта Гидра, выращенной в открытом грунте – 44,00 мг%, тогда как другие опытные варианты показали значение достоверно ниже – 34,32...36,96 мг%. Такая же закономерность была отмечена и по сумме водорастворимых антиоксидантов: максимум в листьях капусты пекинской, выращенной в открытом грунте (13,91 мг-экв АК/г сырой массы), далее содержание антиоксидантов снижалось в ряду КП сорт Гидра (открытый грунт) > КП сорт Гидра (закрытый грунт) = КК сорт Веснянка (закрытый грунт) > КК сорт Веснянка (открытый грунт).

Однако по содержанию полифенолов была выявлена иная закономерность – наименьшее содержание этого показателя в листьях капусты пекинской сорт Гидра, выращенной в закрытом грунте – 14,92 мг-экв ГК/г сухой массы, тогда как в других вариантах опыта показаны значения существенно выше – 17,10...17,91 мг-экв ГК/г сухой массы. По содержанию суммы антиоксидантов в спиртовом экстракте отмечена такая же тенденция: минимум (17,55 мг-экв ГК/г сухой массы) показан в листьях капусты пекинской сорт Гидра, а в остальных образцах – достоверно выше.

Полученные данные свидетельствуют о том, что листья обоих видов капусты содержат значительное количество антиоксидантов, и выращивание пекинской и китайской капусты как в условиях защищённого, так и открытого грунта Московской области позволит ещё значительнее расширить сортимент салатных культур.



УНИКАЛЬНЫЙ ФЕРМЕНТ ИЗ ГЕПАТОПАНКРЕАСА КАМЧАТСКОГО КРАБА

**Пономарева Т.И.¹, Тимченко М.А.^{1,2}, Слядовский Д.А.¹, Позднякова-Филатова И.Ю.³,
Гусев О.⁴, Согорин Е.А.¹**

¹ФГБУН Институт биологического приборостроения Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия;

²ФГБУН институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

³ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской
академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия;

⁴ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

tatyanap91875@gmail.com

Ферменты гепатопанкреаса камчатского краба (*Paralithodes camtschaticus*) активно изучаются с 1980-х годов. Но, несмотря на большое количество проведённых научно-исследовательских работ, его гепатопанкреас остаётся актуальным объектом исследований уникальных ферментов, интересных как с точки зрения фундаментальной науки, так и практического применения. Основным направлением этих работ является исследование протеолитических ферментов, в особенности коллагеназ. Повышенный интерес к коллагеназам краба связан с необходимостью иметь альтернативный источник этого класса ферментов, так как получение коллагеназы из *Clostridium histolyticum* сопряжено с высокими рисками культивирования данного патогенного микроорганизма. Коллагеназы краба хорошо изучены в настоящее время: описаны их свойства, разработаны и внедрены в практику способы их получения, в том числе в промышленном масштабе.

В нашей работе впервые было показано, что гепатопанкреас камчатского краба (ГПКК) наряду с протеолитическими ферментами содержит ранее не изученный фермент – гиалуронидаза – с уникальными свойствами.

Мы исследовали кинетику гидролиза гиалуроновой кислоты (ГК) в присутствии гомогената ГПКК турбодиметрическим методом, методом Моргана-Элсона и с помощью ядерно-магнитного резонанса. В качестве контроля использовали лиазу *S. hyalurolyticus*, в присутствии которой в реакционной смеси наблюдалось повышение поглощения света при длине волны 232 нм, что свидетельствовало об образовании двойной связи в процессе расщепления ГК реакцией β-элиминирования. После добавления гомогената ГПКК к раствору ГК также наблюдалось увеличение поглощения УФ-излучения, что свидетельствовало о расщеплении ГК ферментами гомогената по механизму β-элиминирования как и в случае бактериальной лиазы. Анализ продуктов гидролиза ГК методом 1H-ЯМР подтвердил данное наблюдение – гиалуронидаза ГПКК расщепляет ГК, как и бактериальная лиаза, по механизму β-элиминирования с образованием двойной связи в продукте реакции.

Транскриптомный анализ гепатопанкреаса показал наличие мРНК гиалуронидазы. Секвенирование клонированной кДНК данной мРНК из тканей гепатопанкреаса показало идентичную аминокислотную последовательность.

Таким образом, идентифицированная нами гиалуронидаза краба способна расщеплять ГК по механизму β-элиминирования, который характерен для бактериальных гиалуронидаз (лиаз).



ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА АКТИВНОГО ЦЕНТРА
О-АЦЕТИЛГОМОСЕРИНСУЛЬФИДРИЛАЗЫ ИЗ *CLOSTRIDIODES DIFFICILE*

**Ревтович С.В., Коваль В.С., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В.,
Куликова В.В., Демидкина Т.В.**

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

lyfenkoanna@yandex.ru

Clostridioides difficile представляет собой спорообразующую анаэробную бактерию, обладающую природной устойчивостью к большинству антибиотиков. Она вызывает широкий спектр желудочно-кишечных нарушений, являясь главным возбудителем псевдомембранозного колита. В *C. difficile* синтез L-метионина происходит по пути прямого сульфгидрирования с участием О-ацетилгомосеринсульфгидриказы. Пиридоксаль-5'-фосфат(ПДФ)-зависимая О-ацетилгомосеринсульфгидриказа (КФ 4.2.99.10) катализирует синтез предшественника L-метионина – L-гомоцистеина, расщепляя О-ацетилгомосерин с использованием сульфид-иона. Свойства и механизм действия сульфгидриказ являются на сегодняшний день одними из наименее изученных среди ПДФ-зависимых ферментов.

Ранее нами был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* ген О-ацетилгомосеринсульфгидриказы из *C. difficile*, получены гомогенные препараты фермента и исследованы его биохимические свойства. Выравнивание аминокислотной последовательности фермента с сульфгидриказами из других источников и анализ имеющихся в базах данных трехмерных структур ферментов позволил выяснить, что в структуре О-ацетилгомосеринсульфгидриказы из *C. difficile* остаток тирозина 52 образует водородную связь с фосфатной группой ПДФ, остаток тирозина 107 стабилизирует пиридиновое кольцо ПДФ через π -стэкинг-взаимодействие. Для выяснения роли остатков активного центра Tyr52 и Tyr107 были получены четыре мутантные формы фермента методом сайт-направленного мутагенеза с заменами данных остатков на фенилаланин и аланин. Мутантные формы практически не катализировали реакцию γ -замещения О-ацетилгомосерина: скорость реакции уменьшилась более чем на три порядка, по сравнению с ферментом дикого типа. Анализ спектров поглощения холоферментов методом логнормального разложения позволил сделать вывод, что в мутантных формах присутствует в основном нейтральная форма внутреннего альдимины, являющаяся неактивной, в отличие от активной катионной формы фермента дикого типа. Таким образом, отсутствие водородной связи, стабилизирующей положение ПДФ в активном центре, в Tyr52Phe и Tyr52Ala мутантных формах, а также стэкинг-взаимодействия с пиридиновым кольцом ПДФ в Tyr107Phe и Tyr107Ala мутантных формах приводит к потере ферментативной активности О-ацетилгомосеринсульфгидриказы.

Результаты исследований получены за счет средств Российского научного фонда (проект № 22-24-00255).



ЛАККАЗЫ ГРИБОВ РОДА *MYROTHECIUM* И *CURVULARIA*, ВЫСОКОАКТИВНЫЕ В НЕЙТРАЛЬНО-ЩЕЛОЧНОЙ СРЕДЕ

**Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Мясоедова Н.М., Егорова А.Д.,
Гайдина А.С., Коломыцева М.П.**

ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской
академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

zhanna.renfeld@yandex.ru

Лакказа (КФ 1.10.3.2, *n*-дифенол:кислород оксидоредуктазы, фенолоксидазы) – один из ферментов класса голубых медьсодержащих оксидаз, широко распространенный у бактерий, грибов и растений и способный катализировать окисление ароматических соединений, в основном фенолов и ароматических аминов, с одновременным восстановлением молекулярного кислорода до воды. Этот фермент находит широкое применение в промышленности и биотехнологии.

В отличие от бактериальных лакказ, грибные лакказы обладают высоким окислительно-восстановительным потенциалом, вследствие чего способны катализировать окисление широкого спектра соединений без использования дорогостоящих медиаторов. К сожалению, типичные грибные лакказы наиболее активны в кислой области рН, что препятствует их применению в процессах, протекающих в нейтрально-щелочной среде: в биотопливных ячейках имплантируемых приборов, в клеточном синтезе биоактивных соединений, в нанобиотехнологиях и биосенсорах, при очистке сточных вод и в текстильной промышленности и т.д. Ряд грибов-аскомицетов способен продуцировать нетипичные алкалофильные лакказы, однако таких сообщений немного, что свидетельствует об актуальности поиска нетипичных лакказ и их всестороннего изучения.

В результате настоящей работы были выделены и охарактеризованы новые лакказы аскомицетов *Myrothecium roridum* и *Curvularia geniculata*, наиболее активные с фенольными соединениями в нейтрально-щелочных условиях среды и имеющие значительный потенциал для промышленного использования. Проведена оптимизация условий культивирования с целью повышения продукции этих лакказ. Исследованы их физико-химические, кинетические и спектральные свойства. Определены полные нуклеотидные и аминокислотные последовательности, кодирующие исследуемые лакказы, на основе которых методом гомологического моделирования были получены пространственные структуры. Структурный анализ исследованных лакказ и лакказ с известной трехмерной структурой позволил предположить структурные детерминанты, обуславливающие алкалофильные свойства ферментов.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-Аспиранты № 20-34-90059.



ОСНОВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛИСТЬЕВ
ALLIUM FISTULOSUM L.

Середин Т.М., Марчева М.М., Слюдова Е.А., Молчанова А.В.

ФГБНУ Федеральный научный центр овощеводства, п. ВНИИССОК, Россия

timofey-seredin@rambler.ru

Изучение биохимического состава лука батун позволило выявить сортовые различия и сходство образцов по основным его компонентам. В годы исследований (2014-2021) был проведен биохимический состав листьев коллекционных образцов лука батун. В исследованиях были использованы сорта: Шиодоме, Семилетка, Байя Верда, Легионер, Чиполлино, Русская трапеза, Ишикура Лонг уайт. Исследования были проведены на опытном поле лаборатории селекции луковых культур (ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства»).

Отмечено, что содержание каротиноидов в зависимости от сорта колебалось в диапазоне от 0,03 до 0,19 мг/г. Максимальное содержание каротиноидов наблюдалось у сорта лука батун Шиодоме, максимальное у сорта Чиполлино. Содержание сухого вещества в листьях лука батун в коллекционном питомнике в годы исследований было отмечено в пределах 8,23-13,22%. Следует отметить сорт Ишикура Лонг уайт из изученных сортов содержит максимальной процент сухого вещества (13,2%). Данное наблюдение говорит, о том, что у выделившегося сорта есть возможность сохранять свои товарные качества свежего зелёного лука до 10 суток. У сорта Шиодоме в среднем в годы исследований наблюдалось наименьшее содержание сухого вещества (8,25%). По содержанию моносахаров по сортам коллекционного питомника лука батун различий не наблюдалось. Накопление аскорбиновой кислоты в зависимости от сорта изменялось от 28,16 до 45,67 мг%. У сорта Русская трапеза было отмечено максимальное содержание (45,76 мг%), у сорта Байя Верде и Легионер было отмечено минимальное накопление аскорбиновой кислоты. Также были изучены фотосинтетические пигменты, микроэлементы и радионуклиды в зелёных листьях коллекционного питомника лука батун.

ТРИПТОФАН-114 ЭНДОЛИЗИНА ФАГА T5 И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА СВЯЗЫВАНИЕ
СУБСТРАТА И КАТАЛИЗ

Ситникова Д.С.^{1,2}, Чернышов С.В.², Прохоров Д.А.³, Микулинская Г.В.²

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²ГНЦ ФГБУН Филиал Института биоорганической химии
им. Шемякина и Овчинникова РАН, Пустьино, Россия;

³ФГБУН институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пустьино, Россия

darya_sitnikova_2000@mail.ru

Эндолизин – это ферменты, входящие в состав литических белковых систем бактериофагов. Эндолизин разрушает слой пептидогликана клеточной стенки бактерий, что является основным этапом её деструкции. Эти ферменты обладают специфичностью к



гидролизуемой ими связи. В частности, исследуемый нами эндолизин сифовируса T5 (EndoT5) является L-аланоил-D-глутаматпептидазой.

В противоположность эндолизинам с доменной структурой, в которых функции связывания субстрата и катализа разделены, EndoT5 является глобулярным белком небольшого размера, и его единственный домен одновременно выполняет функции, как связывания, так и гидролиза субстрата.

Сравнительный анализ последовательностей аминокислот и пространственных структур ряда ортологичных EndoT5 эндолизинов выявил консервативный триптофан вблизи активного центра. Положение и свойства этого остатка дают основания предполагать, что он играет основную роль в процессе взаимодействия с пептидогликаном. Изучение участия остатка триптофана-114 EndoT5 в процессе катализа и/или связывания субстрата является целью нашей работы.

Был проведён сайт-направленный мутагенез для получения точечной замены W114A в плазмиде pEndoT5, несущей ген природного белка под контролем промотора фага T7. Целевой белок был получен путем экспрессии мутантного гена в штамме *E. coli* C41(DE3). Фермент был очищен посредством ионообменной хроматографии до электрофоретической гомогенности. Мутантный белок имел глобулярную структуру, схожую с исходным белком, и был полностью растворим.

Согласно количественному спектрофотометрическому анализу, литическая активность у полученного мутанта EndoT5W114A отсутствует. Анализ способности мутанта конкурировать с природным ферментом за субстрат показал, что даже в 1200-кратном молярном избытке мутантный фермент не влияет на скорость гидролиза, в отличие от мутанта по каталитическому аспартату EndoT5D130A, способного конкурентно ингибировать нативный фермент в смеси. Так, в присутствии мутанта EndoT5D130A, добавленного в 1200-кратном молярном избытке, активность нативного фермента упала почти в 19 раз.

Полученные результаты позволяют предположить, что основной функцией консервативного W114 является связывание субстрата, опосредующего акт собственно гидролиза, осуществляемого однодоменным эндолизином бактериофага T5.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАНС-ВЛИЯНИЯ АКСИАЛЬНОГО ЛИГАНДА НА СКОРОСТЬ ОКИСЛЕНИЯ АСКОРБАТА ЦИАНОКОБАЛАМИНОМ

Чебыкин Ю.С., Шубина В.С., Соловьева М.Е., Акатов В.С., Шаталин Ю.В.

ФГБУН институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

hf_95@mail.ru

Кобаламины представляют собой водорастворимые кофакторы, имеющие важное значение в работе жизненно-важных ферментов. Основная роль этих витаминов заключается в переносе электронно-донорной группы на субстрат, включающий стадию восстановления и последующего окисления иона кобальта входящего в состав кобаламина. Данный окислительно-восстановительный процесс сопровождается ослаблением одних связей и усилением других. Термодинамические характеристики транс-эффектов аксиальных лигандов



в кобаламинах были получены для ряда лигандов расчетными методами на основании данных рентгеноструктурного анализа. Тем не менее, влияние субстратов способных напрямую взаимодействовать с кобаламинами, но не формирующих устойчивых комплексов, на электронную структуру практически не изучено. При изучении процесса окисления аскорбата в присутствие цианкобаламина нами были обнаружены минорные изменения в оптических спектрах поглощения характерных для кобаламина. Полосы поглощения в областях 350 и 550 нм в процессе окисления аскорбиновой кислоты снижаются, что может свидетельствовать об ослаблении связи иона кобальта с цианид-анионом. Такое ослабление связи возможно при координации аскорбата в альфа-положении кобаламина и/или восстановлении иона кобальта. Данный процесс может наблюдаться в анаэробных условиях в процессе децианирования кобаламина. В областях спектров 320-340 и 450-500 нм обнаруживаются разнонаправленные, с течением времени, изменения абсорбции, которых могут быть отнесены к влиянию процесса восстановления кобаламина на ослабление связи бензимидазол-кобальт. Изучение спектров поглощения цианкобаламина в средах с различным рН показывает похожие минорные изменения оптической плотности, что, вероятно, связано с диссоциацией бензимидазольного лиганда. Диссоциация бензимидазола происходит в результате изменения транс-эффекта β -лиганда, восстановления иона кобальта, а также изменения доли протонированной формы бензимидазола. Последний процесс происходит при изменении рН раствора, что было продемонстрировано на примере окисления аскорбиновой кислоты. Таким образом, наблюдаемые изменения в областях спектра 320-340 и 450-500 нм, могут быть характеристичны для смещения равновесия в реакции диссоциации бензимидазольного лиганда: «base-on» – «base-off». Данный эффект может отражать изменение скорости реакции окисления субстратов кобаламинами и играть важную роль в нарушении функционирования кобаламин-зависимых мутантных форм белков при орфанных заболеваниях, таких как метилмалоновая ацидурия типа С.

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ НАНОРЕАКТОРЫ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ ПЕСТИЦИДА ПАРАОКСОН: ИССЛЕДОВАНИЯ *IN VITRO* И *IN VIVO*

**Шайхутдинова З.М.^{1,2}, Паширова Т.Н.², Мансурова М.Н.¹, Казакова Р.Р.¹,
Шамбазова Д.Н.¹, Богданов А.В.², Татаринев Д.А.², Массон П.¹**

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия;

²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова – обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

shajhutdinova.z@mail.ru

В настоящее время наблюдается экспоненциальный рост применения биокаталитических реакторов в наномедицине для терапии опухолевых и воспалительных процессов, детоксикации лекарств и ксенобиотиков, коррекции метаболических и генетических дефектов. В отличие от простых коллоидных носителей, биокаталитические нанореакторы и нанофабрики представляют собой компартменты, способные выполнять определенные функции во внутри- или межклеточной среде. Кроме того, стратегия развития нанореакторов является промежуточным звеном при создании искусственных клеток и органов. Известно, что к настоящему времени нанореакторный подход не был применен в



лечения/детоксикации при отравлении пестицидами. Мутанты фосфотриэстеразы термофильных архей *Sulfolobus solfataricus* (ФТЭ) проявили высокую эффективность в отношении фосфорорганических соединений *in vitro*.

Целью данной работы является создание нанореакторов с ферментом ФТЭ для детоксикации фосфорорганического пестицида параоксон (РОХ) и их исследование *in vitro* и *in vivo*.

Нанореакторы представляют собой низкополидисперсные полимерсомы (PDI=0,18) диаметром $139 \pm 3,5$ нм и дзета-потенциалом -19 мВ, содержащие высокую концентрацию фермента (0,02 мМ). Полимерсомы получены в результате самосборки амфифильного блок-сополимера полиэтиленгликоль-полипропиленсульфида (PEG-PPS) методом гидратации липидной пленки. Мембрана полимерсом обеспечивала проникновение РОХ внутрь нанореактора и выход нетоксичных продуктов реакции. Моделирование реакции нейтрализации РОХ в условиях второго порядка *in vitro* показало, что фермент ФТЭ (1 мкМ) инактивировал РОХ (5 мкМ) менее чем за 10 с при 25°C, pH 7,4.

В результате предварительного и постэкспозиционного введения нанореакторов, содержащих 1,6 наномоль фермента, наблюдался сдвиг LD₅₀ (от 0,8 до 15 мг/кг) у мышей, при внутрибрюшинном введении (в.б.) РОХ. Предварительное внутривенное введение 100 мкл нанореактора за 5 мин до введения РОХ (в.б.) защищало мышей от воздействия РОХ (7xLD₅₀). Введение нанореакторов с ферментом в качестве постэкспозиционной обработки через 1 мин после введения РОХ защищало мышей от воздействия 3,3xLD₅₀ РОХ.

Таким образом, терапевтический нанореактор PEG-PPS, содержащий ФТЭ эффективен как при профилактике, так и при лечении мышей, отравленных РОХ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ, проект № 20-14-00155.

Литература.

1. T.N. Pashirova, A.V. Bogdanov, P. Masson, *Chem.-Biolog. Interact.*, 2021, **346**, 109577
2. L. Poirier, P. Jacquet, L. Plener, P. Masson, et al., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2021, **28**, 25081-25106.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ БЕЛКА MUTS ИЗ БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Якушкина Ю.В.¹, Монахова М.В.², Кубарева Е.А.²

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

²НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

dddd80486@gmail.com

В живых организмах от бактерий до человека существует система репарации неканонических пар нуклеотидов («мисматчей») и небольших петель, получившая название MMR (от англ. mismatch repair system). Неканоническими парами нуклеотидов, или «мисматчами», считаются все пары нуклеотидов, кроме Г/Ц и А/Т. Белок MutS действует как



сенсор, сканирующий ДНК в поисках неканонических пар нуклеотидов и небольших инсерционно-делеционных петель.

Объектом данной работы является белок MutS из системы MMR бактерии *R. sphaeroides*, впервые выделенный в нашей научной группе, структура которого не была охарактеризована ранее.

Для понимания процессов, происходящих при репарации «мисматчей», требуются данные о структуре белка и функции его доменов. Хорошо изучен MutS только из *E. coli*. У разных организмов строение и функции доменов MutS несколько отличаются между собой. Следовательно, требуется изучение MutS из различных организмов.

Интерес к *R. sphaeroides* обусловлен вариабельностью её метаболического цикла и способностью выживать в различных условиях окружающей среды. Предположительно эти способности обусловлены наличием метилнезависимой MMR *R. sphaeroides* в отличие от *E. coli*.

В данной работе проведён сравнительный анализ первичной структуры белков MutS из различных организмов для выявления принадлежности MutS из *R. sphaeroides* к определённой группе с помощью алгоритмов BLAST (tblastn). Установлена принадлежность MutS из *R. sphaeroides* к группе MutS1, в которую входит также MutS из *E. coli*, охарактеризованы функциональные мотивы. Предсказана вторичная структура белка MutS из *R. sphaeroides* с помощью биоинформатических сервисов PSIPRED, SABLE, SSPro. Белок содержит (48±8)% α -спиралей, (14±4)% β -структур, (38±9)% неупорядоченных участков (n=3, P=0,95). Экспериментально показано, что денатурация белка MutS из *R. sphaeroides* начинается при 45°C. Методом кругового дихроизма с помощью программы CDPro алгоритмами CDSSTR, CONTINLL, SELCON определена вторичная структура MutS из *R. sphaeroides* в диапазоне температур 15–65°C. Показано, что для обработки спектров кругового дихроизма при низких температурах (15–30°C) наиболее подходящими алгоритмами из программы CDPro являются CONTINLL, CDSSTR, при высоких (35–65°C) – SELCON. Данные кругового дихроизма, полученные при 15°C, коррелируют с предсказанием вторичной структуры изучаемого белка с помощью биоинформатических сервисов.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 21-14-00161).



ЭКОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ РТУТИ В БИОСУБСТРАТАХ НА ТЕРРИТОРИИ КРЫМСКОГО ПОЛУОСТРОВА И РТУТЬ-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ЭФФЕКТЫ

Богданова А.М., Евстафьева Е.В., Тымченко С.Л.

ФГАОУ ВО Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского,
Симферополь, Россия

annuta2607@yandex.ru

Значимым направлением биомониторинговых исследований является определение индикаторов состояния окружающей среды, отражающих степень влияния эколого-геохимических факторов на биоту. Цель работы – определение ртути (Hg) в индикаторных биосубстратах (растительные субстраты, волосы человека) в городах и природных экосистемах Крыма, а также оценка связи содержания Hg в организме жителей с функциональными показателями сердечно-сосудистой и дыхательной систем.

Отбирали пробы листьев тополя черного (n=146) и эпифитных лишайников (n=60) в городах (Армянск, Симферополь, Ялта, Севастополь, Керчь) и на заповедных территориях Крыма. Содержание Hg в волосах определяли у практически здоровых юношей (n=52) и девушек (n=79) 17-20 лет из разных регионов полуострова; производили регистрацию электрокардиограммы (ЭКГ), спирограммы, анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) в состоянии покоя и при проведении функциональных проб. Содержание Hg определяли атомно-абсорбционным методом.

Содержание Hg в лишайниках варьировало в пределах 0,037-0,306 мкг/г, при этом более высокие концентрации ($p < 0,01$) выявлены в южном регионе. Медианные значения Hg в листьях тополя (0,018-0,026 мкг/г) не превышали среднероссийские значения, при этом максимальное содержание отмечено в г. Ялта (0,039 мкг/г). Выявленные территориальные различия могут быть обусловлены такими факторами как морские аэрозоли, наличие ртутных металлогенических зон, трансграничный атмосферный перенос с других территорий.

Анализ Hg в волосах жителей (0,020–0,947 мкг/г) показал отсутствие превышений нормы. Наибольшее медианное значение отмечено в г. Симферополе (0,140 мкг/г), при этом сопоставление данных в листьях тополя (n=63) и волосах (n=80) в этом городе показало совпадение очагов их более высокой концентрации. В результате корреляционного анализа обнаружены значимые связи Hg с показателями состояния сердечно-сосудистой системы: амплитудами ЭКГ зубцов R, T ($-0,22 \leq R \leq -0,20$; $p < 0,05$) в состоянии покоя; показателями ВСР TP, VLF, HF, LF ($0,19 \leq R \leq 0,31$; $p < 0,05$) при проведении функциональных проб. Также отметили более низкие значения частоты дыхания в покое ($-0,26 \leq R \leq -0,18$; $p < 0,05$), жизненной емкости легких, резервного объема выдоха после нагрузки у лиц с большим содержанием Hg в волосах.

Таким образом, при низком содержании Hg в биосубстратах обнаружены ртуть-индуцированные эффекты в отношении кардиореспираторной системы жителей Крыма.



ТЕХНОЛОГИЯ БИОДЕГРАДАЦИИ ПОЛИМЕРОВ С ПОМОЩЬЮ МИКРООРГАНИЗМОВ КИШЕЧНИКА ГУСЕНИЦ *GALLERIA MELLONELLA*

Боровлева П.И., Санкова А.В., Винокуров А.Ю., Чумаков А.А.

БУ ОО ДО «Дворец пионеров и школьников имени Ю.А. Гагарина» Детский технопарк
«Кванториум», Орёл, Россия

polinaborovleva@gmail.com

С каждым годом увеличивается количество мусорных отходов, если политика отношения к ним останется прежней, то к 2050 году около 12 млрд тонн пластиковых отходов окажутся на свалках или окружающей среде. Анализ литературы показывает, решение этой актуальной проблемы может быть весьма неожиданным.

Большая восковая моль, или огневка пчелиная (*Galleria mellonella*) – вид молевидных бабочек из семейства настоящих огневок. Является вредителем медоносных пчёл, обладая способностью утилизировать воск в ульях. А значит, может питаться и сходными по химическому строению полимеру. И все это благодаря уникальной микрофлоре кишечника. Можно ли огневку использовать для утилизации отходов? Именно на этот вопрос и отвечает наш проект.

Мы сформулировали цель проекта, которая заключается в выделении из гусениц огневок смешанной культуры микроорганизмов-деструкторов полимеров и разработке технологии утилизации полимерных отходов. Последняя может быть реализована как напрямую на полигонах, так и при использовании биореактора. Задачи: создать колонию гусениц; выделить из кишечника гусениц смешанные культуры микроорганизмов с последующим их культивированием на специализированных средах; проанализировать смешанные культуры, выяснив их потенциал к разложению полимеров; выяснить способность культур микроорганизмов перерабатывать различные виды полимеров; разработать методику применения выделенных микроорганизмов.

Для поддержания колонии гусениц использовали сбалансированную кормовую смесь. В этих условиях наши «подопечные» активно размножались и росли до требуемого размера.

Произвели посев выделенных микроорганизмов на селективные среды с антибиотиками и воском, в качестве единственного источника углеводов, для получения отдельных групп микроорганизмов.

Выводы: были созданы оптимальные условия для увеличения колоний гусениц; выделены из кишечника смешанные культуры микроорганизмов, которые могут быть культивированы на специальных средах; показали соответствие микроорганизмов консорциума составу микробиома кишечника *Galleria mellonella*; подтвердили способность выделенного консорциума развиваться на содержащих полиэтилен в качестве субстратах средах. В настоящее время производится количественный анализ скорости разложения полимера. Дальнейшие действия по развитию проекта связаны с поиском оптимальных условий, обеспечивающих высокую интенсивность деструкции полимеров и их воссоздание в рамках технологии утилизации полимерсодержащих отходов с помощью биодеструкторов.



ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИСТЬЕВ БЕРЁЗЫ ПОВИСЛОЙ (*BETULA PENDULA*) И ЛИПЫ МЕЛКОЛИСТНОЙ (*TILIA CORDATA*)

Вальков И.Н.¹, Вальков Л.Н.²

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²МБОУ СОШ №3, Пушино, Россия

ivalkov31@gmail.com

В качестве объектов для мониторинга состояния воздуха г. Пушино выступали берёза повислая (*Betula pendula*) и липа мелколистная (*Tilia cordata*).

При оценке состояния воздуха было выбрано по 2 точки для каждого вида (липы и берёзы) – с относительно загрязнённым воздухом (вблизи автодорог) и с предположительно чистым воздухом (контрольная). В каждой точке для оценки состояния деревьев было собрано в случае липы по 240 листьев (по 80 листьев с каждого из 3 деревьев); в случае с берёзой по 400 листьев из каждой точки (по 80 листьев с 5 деревьев). Далее листья сканировались на сканере Epson perfection v19 (изображения были сохранены в виде файла в формате bmp с разрешением 600 dpi и глубиной цвета 24 бита). Сбор и сканирование листьев проводились в 2021 г в рамках 4-летней научной школы г. Пушино.

Сравнение листьев производилось по 3 параметрам: фактору формы ($F = 4\pi S/P^2$, где F-фактор формы; S-площадь листа; P-периметр); цвету (оценивали значения 3 основных цветов RGB – Red Green Blue в программе Adobe Photoshop) и спектру отражения (измеряли микроспектрофотометром X-Rite 1One Pro GretagMacbeth с шагом в 10нм и диапазоном от 380 до 730 нм). Значения всех характеристик вычислялись для каждого листа, затем усреднялись для каждой точки.

Значение фактора формы липы в относительно загрязнённой точке ниже на 6%, чем в контрольной. Для липы абсолютные показатели 3 цветов в грязной точке ниже, чем в чистой на 22, 19 и 18% соответственно. Максимальные различия значений спектра: в области 550 нм спектр отражения листьев грязной точки на 15% ниже, чем в чистой; в полосе 730 нм значение спектра отражения в грязной точке на 11,5% ниже, чем в контрольной.

Результаты анализа показателей листьев берёзы: значение фактора формы берёзы в относительно грязной точке ниже на 6%, чем в контрольной. Значение красного цвета в грязной точке ниже, чем в чистой на 12%, зелёного на 14%, значение синего цвета в грязной точке выше на 16%. Значения спектра отражённого света в относительно грязной точке ниже, чем в чистой на 56% (в полосе 530 нм) и 50% (730 нм) соответственно.

Таким образом, было показано, что измерение комплекса параметров листа растения позволяет неинвазивно производить долгосрочный мониторинг состояния среды, в которой находится объект.

Выражаем благодарность Тирасу Х.П. – к.б.н., зав. Кафедрой естественных наук ПушГЕНИ, с.н.с. ИТЭБ РАН, Нефёдовой С.Е. – аспиранту ИТЭБ РАН.



РАЗРАБОТКА ТЕХНИЧЕСКОГО РЕШЕНИЯ СОВМЕЩЕНИЯ РАКОВИНЫ ДЛЯ МЫТЬЯ РУК С БАЧКОМ ДЛЯ УНИТАЗА

Весновский В.В.

ГБОУ Лицей №24, Санкт-Петербург, Россия

vsevolodvesnovskii@gmail.com

Современное общество все чаще и чаще задумывается о проблемах загрязнения окружающей среды и рационального ресурсопотребления. Что же касается статистики, то определено, что из всего объема потребляемой воды в доме, на смыв унитаза приходится около тридцати процентов. Мы продемонстрируем, как просто экономить воду, предоставим метод, позволяющий ее оптимизировать .

Цель работы – разработать техническое решение совмещения раковины для мытья рук с бачком для унитаза. Данная технология поможет:

- Рационализировать потребление пресной воды
- Уменьшить экономические потери в потреблении воды
- Повысить гигиеническую обстановку в местах массового скопления людей

В ходе выполнения исследовательской работы была выявлена частота смывов и приблизительный объем смываемой воды. Путем несложных математических операций были выявлены следующие данные:

Среднее количество смываемой воды за раз – 4 л, частота смывов на человека в день – 4.6 раз.

Используя полученные данные нетрудно вычислить, насколько существенным окажется внедрение данной технологии. Особенно выгодно это для больших торговых центров, больниц, школ и других мест, где есть общественные туалеты. Таким образом человек за один день сможет сохранить 18.4 л воды ($4 * 4.6$), за месяц – 550 л ($18.4 * 30$), а, например, Санкт-Петербург с населением в 5.38 млн за один месяц может сохранить около 3 млн тонн воды ($5.38 \text{ млн.} * 550 \text{ л}$). Это эквивалентно 3.5 Ладожского озера, что не может не удивлять. Также, не менее важным фактом является то, что мыльный раствор будет поступать в унитаз и это поможет избавиться от патогенных микроорганизмов, т.е. теперь уменьшается риск заражения кишечной палочкой, шигеллой, ротавирусной инфекцией, вирусом Коксаки и даже острыми респираторными инфекциями.

Результаты, которые удалось получить после проведения исследования, наглядно демонстрируют необходимость бережного пользования воды, важность сохранения которой, является одной из самых масштабных проблем современного мира.



СДВИГИ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ПОЧВЕ, ОПАДЕ И БИОМАССЕ РАСТЕНИЙ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НАГРЕВАЮЩЕГО И ИССУШАЮЩЕГО ЭФФЕКТОВ ФАКЕЛОВ ПОПУТНОГО ГАЗА

Дударева Д.М., Квиткина А.К., Евдокимов И.В.

Институт физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН,
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

darya_dudareva@mail.ru

Глобальные изменения климата на региональном уровне проявляются в форме заметных изменений абиотических факторов – температуры и количества осадков с нехарактерной для данного региона динамикой, а также с увеличением частоты катастрофических природных событий. Биологический круговорот минеральных элементов в системе взаимоотношений между растительностью и почвой является одним из наиболее информативных показателей функционирования лесных биогеоценозов. Исследования потоков питательных элементов одновременно с миграционно-аккумулятивными процессами и водно-воздушными режимами почв имеет важное значение при оценке формирования фитоценозов и почвообразовательных процессов в лесных экосистемах. Мы провели анализ на содержание 13 элементов в биомассе растений и почве.

Объектами исследования были образцы почвы и растений, отобранных на пробной площади (мониторинговой площадке) около действующего факела попутного газа (почва подзол иллювиально-железистый стратифицированный песчаный), под молодым сосняком (*Pinus silvestris* L.) в окрестностях г. Покачи (Ханты-Мансийский автономный округ). Основные усилия были направлены на исследование секций с максимальным, умеренным и слабым воздействием факела, соответственно (секции I, III и VII).

Анализ на содержание главных биофильных элементов (углерода, азота и фосфора) показал, что есть небольшие закономерности в сторону повышения их содержания по мере удаления от факельной установки, т.е. при снижении теплового воздействия. Выявлена интересная закономерность магния в повышенном содержании в III секции в хвое и древесине по сравнению с другими секциями. Мы предполагаем, что это связано с оптимальными условиями в температуре и влажности, которые сказываются на приросте древостоя и, следовательно, на повышенном содержании магния.

В целом практически все исследованные нами макро- и микроэлементы проявили устойчивость в содержании в биомассе и почве.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант 20-04-00343.



РАЗЛИЧИЯ В УСТОЙЧИВОСТИ К УФ-ИЗЛУЧЕНИЮ У ГЛУБОКОВОДНЫХ И ЛИТОРАЛЬНЫХ БАЙКАЛЬСКИХ АМФИПОД

**Кондратьева Е.С., Ржечицкий Я.А., Гурков А.Н., Верещагина К.П.,
Шатилина Ж.М., Тимофеев М.А.**

ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет НИИ биологии, Иркутск, Россия

lizzarium@gmail.com

Организмы, населяющие фотическую зону озера Байкал, испытывают выраженное влияние солнечной радиации и, в том числе, УФ-излучения. На практике это означает, что солнечное УФ-излучение в фотической зоне Байкала может ограничивать распространение эврибатных представителей глубоководной байкальской фауны и возможность их миграции в сублитораль и литораль озера. В данном исследовании проводили оценку влияния УФ А и УФ Б на физиологические параметры – выживаемость и двигательная активность, и биохимические показатели – активность ферментов антиоксидантной системы (пероксидаза, глутатион S-трансфераза, каталаза) байкальских эндемичных литоральных амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* и эврибатного представителя глубоководных амфипод *Ommatogammarus flavus*.

Амфипод экспонировали в условиях УФ А и УФ Б излучения. В качестве параллельного контроля использовали группу амфипод, которых освещали лампами дневного света полного спектра. Контрольные и экспериментальные лампы были выровнены по количеству фотонов, испускаемых в диапазоне 400-750 нм. В ходе экспозиции литорального *E. verrucosus* в условиях освещения как УФ А, так и УФ Б смертность рачков достигла 3% в течение 10 дней. Начало гибели глубоководного *O. flavus* при воздействии УФ А отмечали уже в 1-ые сутки эксперимента. Спустя 10 суток эксперимента гибель амфипод данного вида составляла 60% при воздействии УФ А, и 100% при воздействии УФ Б. Для *E. verrucosus* не выявлено статистически значимых изменений двигательной активности по сравнению с таковым в группе светового контроля. У глубоководных *O. flavus* наблюдали тенденцию к снижению двигательной активности через 10 суток экспозиции при воздействии УФ А, а при воздействии УФ Б двигательная активность снижалась на 6 и 8 сутки экспозиции. Показано, что у *E. verrucosus* в условиях воздействия УФ А и УФ Б не происходило изменения активности ферментов антиоксидантной системы. В то время как у глубоководного *O. flavus* отмечали активацию ГСТ – через 3 суток при воздействии УФ А и через 3 и 6 суток при воздействии УФ Б. Полученные результаты подтверждают гипотезу об эволюционно обусловленных различиях в устойчивости литоральных и глубоководных байкальских амфипод к ультрафиолету.

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Госзадания № FZZE-2020-0023.



ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ВЫСШИХ РАКОБРАЗНЫХ

**Ермолаева Я.К., Долинская Е.М., Бирицкая С.А., Теплых М.А., Бухаева Л.Б.,
Пушница В.А., Голубец Д.И., Лавникова А.В., Коркина Т.В.,
Карнаухов Д.Ю., Зилов Е.А.**

ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

erm.yana@mail.ru

Световое загрязнение – это загрязнение, вызываемое использованием искусственных источников освещения в ночное время, которое негативно влияет на сообщества в экосистемах, нарушая суточные режимы организмов. Для выяснения влияния светового загрязнения на двигательную активность высших ракообразных мы провели ряд экспериментов с разными типами освещения.

Для исследования влияния светового загрязнения на двигательную активность брали следующие виды: *Neocaridina denticulata sinensis* (Crustacea, Decapoda), *Gammarus lacustris* (Crustacea, Amphipoda), *Gmelinoides fasciatus* (Crustacea, Amphipoda). Для каждого вида проводилось 6 экспериментов с разным освещением: дневным, ночным (0 лк), тёплым с интенсивностью 2-2,5 лк ночью, тёплым с интенсивностью 10-11 лк ночью, холодным с интенсивностью 2-2,5 лк ночью и холодным с интенсивностью 10-11 лк ночью. Для каждого эксперимента брали 20 особей одного вида и записывали видео с их передвижениями. Далее полученные видеозаписи обрабатывались с помощью программы ImageJ и плагина MTrackJ для подсчёта расстояния, пройденного каждой особью за 15 минут под определенным освещением. Полученные данные обрабатывались с помощью языка программирования R. Для попарного сравнения полученных расстояний в зависимости от освещения использовался тест Данна.

Для *N. denticulata sinensis* с помощью теста Данна значимые различия ($p < 0,05$) были получены между дневным и тёплым 2-2,5 лк освещением, холодным 10-11 лк и тёплым 2-2,5 лк, холодным 2-2,5 лк и тёплым 2-2,5 лк, тёплым 10-11 лк и тёплым 2-2,5 лк, ночным и тёплым 10-11 лк. Для *G. lacustris* значимые различия были получены между дневным и ночным освещением, дневным и тёплым 2-2,5 лк, ночным и холодным 10-11 лк, ночным и холодным 2-2,5 лк, ночным и тёплым 10-11 лк, холодным и тёплым по 10-11 лк, холодным 10-11 лк и тёплым 2-2,5 лк, холодным и тёплым по 2-2,5 лк, тёплым 10-11 лк и тёплым 2-2,5 лк. Для *Gm. fasciatus* значимые различия получены между дневным и ночным освещением, ночным и холодным 10-11 лк, ночным и холодным 2-2,5 лк.

Тёплое освещение с интенсивностью 10-11 лк в ночное время повышает двигательную активность у *N. denticulata sinensis*, при этом тёплый 2-2,5 лк свет понижает двигательную активность, по сравнению с дневной. У *G. lacustris* двигательная активность повышается ночью при тёплом освещении в 10-11 лк и обоих типах холодного. Оба типа холодного освещения повышают двигательную активность ночью у *Gm. fasciatus*.

Работа поддержана проектом Минобрнауки России № FZZE-2020-0026.



БИОИНДИКАЦИЯ СОСТОЯНИЯ ПЕТРОЗАВОДСКОЙ ГУБЫ ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ГЛУБОКОВОДНОГО МАКРОЗООБЕНТОСА

Исакова К.В.

Федеральный исследовательский центр Карельский научный центр РАН,
Институт водных проблем Севера, Петрозаводск, Россия

ksusha_isakova@mail.ru

Экосистема Онежского озера подвергается антропогенному воздействию, особенно изолированные губы, как например крупный залив Петрозаводская губа Онежского озера. Побережье губы подвержено действию большого количества ливневых стоков содержащих тяжелые металлы и нефтепродукты. Все это приводит к накоплению загрязняющих веществ на дне залива, где обитают организмы макрозообентоса, являющиеся важнейшими индикаторами загрязнений. Важно проводить оценку состояния губы, поскольку она является источником водоснабжения г. Петрозаводска.

Цель работы состоит в изучении состояния Петрозаводской губы с помощью показателей глубоководного бентоса за период с 2017 по 2020 года.

Пробы бентоса отбирались с мая по октябрь с помощью дночерпателя автоматического коробчатого с площадью захвата 0.025 м². Станции отбора проб: напротив городского побережья – Р_5; центральная часть – Р_2 и Р_3; отдалённая от берега станция – Р_4. Камеральная обработка материала проводилась по стандартным методикам. Определение организмов бентоса до видов производилось с помощью микроскопа ЛОМО Микмед-6. Был рассчитан индекс В.И. Попченко для оценки загрязненности губы, отражающий отношение массовых и устойчивых к загрязнению видов олигохет к их общей численности. Расчеты производились в среде R.

На станции Р_5 по численности и биомассе преобладают малощетинковые черви (Oligochaeta) ($N_{cp} - 0.16$ тыс. экз./м², $В_{cp} - 2.5$ г/м²). Причем преобладающим семейством является Tubificidae: *Spirosperma ferox* (Eisen, 1879) (0.06 тыс. экз./м²) и *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) (0.01). По литературным данным эти виды являются наиболее устойчивыми к загрязнению. Индекс В.И. Попченко был равен 0.86, что позволяет отнести этот район к загрязненному. На удаленных от города станциях Р_2 и Р_3 начинают преобладать реликтовые ракообразные (Amphipoda) ($N_{cp} - 0.67$ тыс. экз./м², $В_{cp} - 4.1$ г/м²), однако индекс В.И. Попченко равен для Р_2 – 0.52 и для Р_3 – 0.74, что характеризует эти районы как загрязненные. В литературе описана аналогичная картина для данных станций в 2014 году. На станции Р_4 основу составляют ракообразные (1.81 тыс. экз./м² и 11.75 г/м²), что говорит о благополучной экологической ситуации в данном районе, что объясняется его отдаленным расположением от источников загрязнения. Индекс В.И. Попченко равен 0.22, что соответствует чистым и относительно чистым водам.

Таким образом, видовой состав глубоководного макрозообентоса свидетельствует о сильном загрязнении дна вблизи западной части Петрозаводской губы, что объясняется поступлением ливневых стоков Петрозаводска.



ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ БАКТЕРИЙ *PARACOCCLUS YEEI* В-3302 НА
СУБСТРАТНУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В СОСТАВЕ
БИОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ЭЛЕМЕНТА БПК-БИОСЕНСОРА

Козлова Т.Н., Юдина Н.Ю.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

kozlovatatyana_1993@mail.ru

В условиях современного интенсивного промышленного производства произошло значительное загрязнение водных объектов органическими соединениями. Важным показателем биодegradации органических поллютантов в сточных водах является биохимическое потребление кислорода (БПК), однако стандартный тест БПК₅ требуют длительного времени, поэтому в последнее время разрабатываются экспресс-БПК-биосенсоры.

Основным компонентом БПК-биосенсора является биочувствительный элемент с широким спектром окисляемых субстратов. Для его формирования, как правило, используют чистые культуры микроорганизмов, ранее подверженные замораживанию, что значительно снижает активность криочувствительных бактерий вследствие повышенного осмотического давления внутри клеток при оттаивании и замораживании. Лиофилизация при правильно подобранных криопротекторах значительно повышает срок хранения биологического материала, однако стрессовые факторы способны изменить окислительную активность бактерий на определённые органические соединения [1]. Поэтому целью данной работы является сравнение субстратной специфичности бактерий *Paracoccus yeai* В-3302, ранее подверженных замораживанию [2], и в лиофилизированном состоянии в составе биорецепторного элемента БПК-биосенсора.

Для проведения измерений использовали анализатор БПК-термооксиметр «ЭКСПЕРТ-009» с кислородным датчиком с иммобилизованными в диализную мембрану (Sigma-Aldrich, США) лиофилизированными бактериями *P. yeai* В-3302. Оценка субстратной специфичности проводилась по 33 субстратам (концентрация в кювете 12 мМ), относящимся к разным классам органических соединений. Установлено, что БПК-биосенсоры имеют схожий профиль субстратной специфичности. Однако лиофилизированные бактерии показали метаболическую активность на формальдегид и дали более высокий ответ на метанол, которые являются высокотоксичными веществами. Это может свидетельствовать об активации ферментных систем микроорганизмов после стрессовых факторов при лиофилизации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Литература.

1. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – №. 3. – С. 5-12.
2. Абрамова Т.Н., Козлова Т.Н., Юдина Н.Ю. Субстратная специфичность бактерий *Paracoccus yeai*, выделенных из активного ила // «Экотоксикология-2016». Тула – 2016. – С. 19-21.



ИССЛЕДОВАНИЕ ПИЩЕВОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ ГОЛОЖАБЕРНОГО МОЛЛЮСКА
DORIPRISMATICA ATROMARGINATA (NUDIBRANCHIA, CHROMODORIDIDAE)
МЕТОДОМ МАРКЕРНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Комисаренко А.А.

ФГБУН Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН,
Владивосток, Россия

komisarenko.anatoly@gmail.com

Голожаберный моллюск *Doriprismatica atromarginata* (Cuvier, 1804), семейства Chromodorididae, широко распространен в Индо-Тихоокеанском регионе, включая южную Африку, Китай, Папуа-Новую Гвинею, Австралию и Японию. Обитает на малых глубинах (8–25 м), преимущественно на каменистых грунтах среди колоний кораллов и губок.

Несмотря на большой ареал, данных по экологии вида недостаточно. В основном, *D. atromarginata* является объектом для исследования вторичных метаболитов, получаемых с питанием. Как и многие голожаберные моллюски, он имеет узкую пищевую специализацию. Питается моллюск демоспонгиевыми губками (Класс Demospongiae). Изучение видов, эволюция которых в первую очередь связана с пищевой специализацией – это комплексный процесс, где большой вклад может внести изучение маркерных жирных кислот (МЖК). Выявление источников пищи важно для понимания экологии и трофических взаимодействий в морских экосистемах, для чего МЖК уже успешно применялись при исследовании гидробионтов тропических и северных морей.

В настоящем исследовании впервые был проанализирован состав жирных кислот (ЖК) из общего липидного экстракта голожаберного моллюска *D. atromarginata*. Образцы собраны на побережье Вьетнама из трёх географических точек (не менее 5 экземпляров в каждой): в районе архипелага Катба (20°47'5 N; 107°06'0 E), рядом с островом Ко То (21°03'0 N; 107°46'2 E) и рядом с островом Хон Гио (17°54'7 N; 106°40'2 E). Статистический анализ проведен с применением языка программирования R, с оценкой достоверности результата (p-values). Использовался многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), метод многомерного шкалирования (MDS) и метод главных компонент (PCA).

Анализ состава ЖК показал высокое содержание кислот с нерегулярным расположением двойных связей (НРДС ЖК), преимущественно 26:2 Δ^{5,9} (до 6%, от суммы всех ЖК), 25:2 Δ^{5,9} и 22:2 Δ^{7,13} (до 2.5% и 3.5%, соответственно) во всех образцах. Такие ЖК характерны для демоспонгиевых губок, где они синтезируются за счет специфической Δ⁵ десатуразы. Голожаберные моллюски не способны самостоятельно синтезировать НРДС ЖК, поэтому выявление у них таких кислот однозначно свидетельствует об их пищевом происхождении.

ЖК состав особей собранных возле острова Хон Гио существенно отличался (F=8.660, p=0.0047) повышенным содержанием 22:6(n-3), 22:5(n-3), 24:6(n-3) и 26:2 Δ^{9,19}. Остров Хон Гио географически удалён от других двух точек сбора. Можно предположить, что в данном биотопе меняется видовой состав губок и/или их симбиотических микроорганизмов.



ОЦЕНКА ЗАРАЖЕННОСТИ ЭКТОПАРАЗИТАМИ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ПРИ ИХ ОТЛОВЕ ЛОВУШКАМИ ГЕРО

Кочерова Н.А., Беспятова Л.А., Бугмырин С.В.

Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия

sbugmyr@mail.ru

Мелкие млекопитающие являются резервуарными хозяевами многих опасных для человека и животных природно-очаговых инфекций, поддержание и распространение которых обеспечивается массовым паразитированием различных видов эктопаразитов. Широко применяемым методом является отлов мелких млекопитающих давилками Геро, с помощью которого можно изучить таксономический состав и численность эктопаразитов. Недостатком метода является сложность отслеживания времени поимки животного. Эктопаразиты после гибели хозяина покидают его, а отсутствие сведений о длительности пребывания животных в ловушке затрудняет интерпретацию результатов по их зараженности. Целью работы была верификация количественных оценок зараженности эктопаразитами мелких млекопитающих, отловленных ловушками Геро.

Для анализа использованы данные, полученные с помощью сконструированной линии ловушек с автоматической регистрацией времени поимки животного в период с 2013 по 2021 гг. в районе Гомсельского научного стационара ИБ КарНЦ РАН. Всего в экспериментальную линию было поймано 84 особи мелких млекопитающих. Дополнительно, мы сравнили зараженность мелких млекопитающих, добытых разными способами: ловушками или канавками.

По результатам работы экспериментальной линии ловушек было показано, что наиболее существенное и быстрое снижение численности после гибели животного отмечено для *Ixodes persulcatus*. Для блох характерно покидание хозяина после его поимки в течение первых 4 часов. Численность вшей заметно снижается через 9 часов после гибели животного. Для гамазовых клещей отмечается постепенное снижение численности паразитических и увеличение численности свободноживущих видов. При сравнении мелких млекопитающих, пойманных с помощью давилки Геро и канавок, получены значимые межгрупповые различия встречаемости и индекса обилия для всех групп эктопаразитов. Более высокая зараженность отмечена у животных при их отлове с помощью канавок.

В целом, наши результаты подтверждают основное правило о том, что эктопаразиты со временем покидают тело погибшего хозяина. В большей мере это относится к блохам и иксодовым клещам. Фактор длительности пребывания в ловушке вносит существенный вклад в наблюдаемые вариации численности эктопаразитов, что следует учитывать при построении каких-либо прогностических моделей, в которых зараженность мелких млекопитающих важная составляющая расчетов.

Финансовое обеспечение осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0005).



СПЕЦИФИКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПОЧВЫ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Мужехов А.А., Дзармотова З.И.

ФГБОУ ВО Ингушский государственный университет, Магас, Россия

atsuroev@list.ru

Современное человечество, признавая весь ущерб, причиненный окружающей среде при добыче и переработке нефти, разработало различные методы очистки почв и месторождений нефти и других видов углеводородного сырья путем использования продуктов переработки в области транспорта, топлива и продукции. Также разработана биотехнология, которая использует определенные виды микроорганизмов, которые могут обрабатывать углеводороды для формирования системы мер по восстановлению окружающей среды в районах, где происходит загрязнение нефтью. По мере того, как количество добываемой в мире нефти продолжает расти, а количество нефтепродуктов также стремительно растет, большинство ученых считают, что загрязнение этими веществами является самым крупным видом загрязнения, особенно с существенным воздействием на деградацию почвенного покрова. Нефть и нефтепродукты, вылитые на землю, всасываются очень быстро и адсорбируются на частицах грунта, поэтому очистка почвы очень трудоемкий и сложный процесс. Загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами меняет физические и химические свойства микрофлоры, которая живет во всех слоях почвы, она погибает практически полностью, а также умирают или покидают территорию важные для микрофлоры организмы, которые улучшают почву (земляные черви и т. д.). Беспозвоночные, которые живут в почве (например, коллемболы, нематоды и т. д.) также умирают.

Содержание нефти в почве приводит к изменению структуры почвы, уничтожению сети микрокапилляров, почва теряет способность удерживать влагу, происходит нарушение проницаемости и обмена воздуха в почве, часть почвенного покрова становится анаэробной, что осложняется снижением способности проникновения фракции легких углеводородов в низший слой почвы, а верхний, то есть гумусовый слой, пропитывается высокомолекулярными соединениями углеводорода циклического типа. Нефтепродукты проявляют «токсическое» воздействие на экосистему. Поскольку свойства нефти являются органическими, естественно, что в биосфере существует механизм, который позволяет почве самоочищаться от этого типа инородного тела. Этот процесс обеспечивается не только абиотическими факторами, описанными выше, такими как наличие солнечной радиации, ультрафиолетового излучения, ветра и высокой температуры, но и биологическими факторами деградации нефти, наиболее важным из которых является естественный барьер – почва.



АДАПТАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS PUTIDA* BS394 (PBS216)
И *PSEUDOMONAS VERONII* DSM 11331Т К ФЕНОЛУ С ЦЕЛЮ СОЗДАНИЯ
БИОАНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕНОЛЬНОГО ИНДЕКСА
В ВОДНЫХ СРЕДАХ

Перчиков Р.Н.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия;

²Лаборатория биологически активных соединений и биоконструктов, ТулГУ, Тула, Россия

perchikov_roma@mail.ru

Фенол является одним из наиболее часто встречающихся загрязнителей окружающей среды. Сброс таких соединений в водоемы негативно влияет на состояние живых организмов: даже при воздействии минимальных доз. В российских лабораториях природоохранного профиля фенольный индекс (ФИ) определяют по ПНД Ф 14.1:2.105-97 который имеют ряд недостатков. Тенденция к упрощению и автоматизации методов анализа, привела к созданию биосенсоров для определения фенола. Микробные сенсоры подобны датчикам на основе ферментов, но менее избирательны.

Для повышения селективности анализа микроорганизмы должны наиболее хорошо окислять фенол и его производные. В качестве биоматериала использовали штамм микроорганизмов *Pseudomonas veronii* DSM 11331Т, выделенные ранее из активного ила и *Pseudomonas putida* BS394 (PBS216). Проводилась адаптация микроорганизмов к фенолу. Последовательным пересевом постепенно увеличивают концентрацию фенола и снижают концентрацию глюкозы, до тех пор, пока фенол не станет единственным источником углерода. На первых этапах адаптации наблюдается увеличение ответа на сахара. Это связано с тем, что адаптация проводится на среде, содержащей большую концентрацию глюкозы. Но при увеличении концентрации фенола происходит снижение ответов на другие субстраты. Исследование влияния процессов адаптации на аналитические характеристики биосенсора проводили в условиях медиаторного биоэлектрокатализа. В качестве медиатора использовали ферроцен.

Формирование рецепторного элемента с высокой специфичностью к фенолу является одной из целей адаптации бактерий. При содержании в анализируемой пробе воды других субстратов, на которые наблюдается высокий ответ, результаты определения ФИ будут некорректны. Количество субстратов, окисляемых *P. veronii*, уменьшилось, что говорит о постепенном увеличении их специфичности к фенолу. Но, так как на финальной стадии, кроме фенольных производных, микроорганизмы окисляют некоторые спирты и сахара, в разы интенсивнее, чем фенолы – результаты адаптации не удовлетворяют требования к биоматериалу

Основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что микроорганизмы *P. putida* имеют более высокое сродство к субстрату, чем *P. veronii*. За 3 этапа адаптации микроорганизмов *P. putida* удалось снизить количество окисляемых субстратов с 20 до 16, на финальном этапе адаптации их количество составило 17. В процессе адаптации микроорганизмов *P. veronii* число субстратов снизилось с 19 до 11. На 13 этапе адаптации микроорганизмов *P. putida* был получен ответ на 1М фенол, эта способность сохранилась на финальной стадии.



ВЛИЯНИЕ МИКРОЧАСТИЦ ПЭТ НА ФОРМИРОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ *D.MELANOGASTER*

Сайфутдинова А.Р., Костенко В.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

aliya.sajfutdinova@list.ru

Воздействие микропластика (МП) с каждым годом вызывает озабоченность во всем мире из-за его непрерывного накопления в окружающей среде, глобального распространения и потенциальных рисков для здоровья живых организмов и сохранения целостности природных экосистем. В недавних исследованиях на *Eisenia fetida* среди эффектов МП из полиэтилена были продемонстрированы его способности вызывать окислительный стресс в организмах червей и существенные повреждения тканей (Chen, 2020). Поэтому, частицы МП могут распространяться через летающих насекомых, заражая новую среду и угрожая другим организмам.

D. melanogaster – удобная тест-система для изучения генотоксичности различных веществ и факторов окружающей среды, поскольку у этого организма есть генетические особенности, делающие его универсальным биообъектом (Rand, 2010). Поэтому целью данной работы является оценка влияния микрочастиц полиэтилентерефталат (ПЭТ) в отношении адаптивных признаков *D. melanogaster*.

В работе использовали линию дрозофил *Canton-S*. Мух культивировали на стандартной сахарно-дрожжевой среде. В исследовании использовались микрочастицы полиэтилентерефталата размером 0.1 мм в концентрации 0.04 г на 1 мл питательной среды. Контрольная группа была выращена на среде без добавления МП. Потенциально токсичное действие ПЭТ изучали по изменению параметров: частота гибели на эмбриональной и постэмбриональной стадиях развития, жизнеспособность на стадии имаго и плодовитость. Результаты были обработаны в программе GraphPad Prism 6.0.

Культивирование дрозофил на стадии личинок на среде с добавлением МП из ПЭТ в концентрации 0.04 г/мл приводит к достоверному снижению жизнеспособности самок в 1.57 раз и самцов в 1.97 раз по сравнению с контрольной группой ($p < 0.05$). Отмечается, что культивирование личинок дрозофил на среде с ПЭТ в исследуемой концентрации снижает плодовитость дрозофил в 1.77 раз ($p < 0.05$). Отмечено достоверное увеличение эмбриональной гибели на ранних этапах развития (0-17 ч.) в 2 раза у дрозофил, питающихся средой с добавлением ПЭТ в концентрации 0.04 г/мл по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

Таким образом, введение ПЭТ в среду в концентрации 0.04 г/мл оказывает негативное влияние на адаптационные способности модельного организма *D. melanogaster*.



ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОД ОЗЕРА БАЙКАЛ ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Тельнова Т.Ю., Моргунова М.М., Шашкина С.С., Аксенов-Грибанов Д.В.

ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

telnovatamara1410@gmail.com

Загрязнение водоемов различными токсикантами и лекарственными препаратами является одной из наиболее значимых и актуальных проблем, вызванных индустриализацией и развитием биофармацевтики. Именно лекарственные препараты могут оказывать непредсказуемые и негативные эффекты на экосистемы. Ранее лекарственные препараты были обнаружены в таких экосистемах, как Восточно-Китайское (Южное) море, в водоемах стран ЕС, США и даже в обитателях Марианской впадины.

Особую значимость исследования по анализу наличия лекарственных препаратов приобретает и для эндемичных обитателей древних экосистем. Одной из таких экосистем, отличающихся своей структурной и экологической сложностью, выступает экосистема озера Байкал и ее обитатели. Целью данного исследования являлось выявление метаболитов лекарственных препаратов в амфиподах озера Байкал с помощью подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС).

Оценку контаминации экосистемы лекарственными препаратами проводили на примере эндемичных амфипод вида *Eulimnogammarus verrucosus*. Для проведения качественного анализа и для определения параметров ионизации молекул, разработки методов и оценки эффективности хроматографического разделения применяли стандартные образцы таких лекарственных препаратов, как ацетилсалициловая кислота, парацетамол, ибупрофен, тетрациклин, азитромицин. Исследования выполнены на базе хромато-масс-спектрометрического комплекса Agilent Infinity II с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470B(QQQ).

В ходе настоящего исследования был показан факт загрязнения лекарственными препаратами обитателей озера Байкал в следовых количествах, что может негативно сказываться как на самой экосистеме, так и на ее обитателях при миграции загрязнителей по трофическим цепям.

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно – образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал) и Гранта Президента РФ (МК-1245.2021.1.4).



СОВРЕМЕННЫЕ BIOTEХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К РАЗМНОЖЕНИЮ РАСТЕНИЙ РОДА *QUERCUS*

Тимаков А.А.¹, Хусаинова А.Р.¹, Окулова Е.А.¹, Зонтиков Д.Н.², Сергеев Р.В.¹

¹ФГБОУ ВО «Поволжский государственный технологический университет»,
Йошкар-Ола, Россия;

²ФГБОУ ВО Костромской государственной университет, Кострома, Россия

timach@mail.ru

Представители рода *Quercus* (дубы) в России локализируются в европейской (3,52 млн га) и дальневосточной частях (2,46 млн га) [1]. В связи с сокращением площадей природных дубрав разработаны федеральные программы их сохранения и изучения. Исследователи отмечают множество проблем, связанных с этой породой: большое количество паразитирующих насекомых, снижение репродуктивной способности и т.д. [2]. Таким образом, очевидна проблема сохранения дубрав в России и мире. Решением проблемы может стать разработка биотехнологических методов получения посадочного материала дуба на основе изучения современных зарубежных подходов в этой области.

В работе Maria Jose Cernadas et al. раскрывают суть так называемого «синдрома вымирания дуба», а также описывается способ микроразмножения дуба с помощью пролиферации меристем пазушных почек с указанием способа стерилизации эксплантов и составов использованных питательных сред [3]. В исследовании Qiansheng Li et al. подробно изучено влияние среды WPM и концентрации ВА на адаптацию *Quercus aliena* Blume *in vitro* [4]. Исследователи обнаружили эффект апикального доминирования и сделали вывод о том, что для улучшения пролиферации побеги нужно делить на узловыe сегменты, удаляя верхушку. В работе Andrea N. Brennan et al. показан способ введения в культуру *in vitro* зрелых тканей дуба, в отличие от указанных выше исследований, которые использовали только ювенильный материал, при этом были обнаружены затруднения при введении в культуру *in vitro* [5].

Таким образом, получена информация о влиянии различных факторов на микроразмножение дуба *in vitro*. За счет применения современных биотехнологических подходов и их улучшения можно решить проблему сохранения дубрав в России.

Работа выполнена с использованием ресурсов ЦКП «ЭБЭЭ», г. Йошкар-Ола при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-674)

Литература.

1. Калининченко Н.П. Дубравы России / Н.П. Калининченко. – М.: ВНИИЦлесресурс, 2000. – 536 с.
2. Молчанов А.А. Воздействие антропогенных факторов на лес / А.А. Молчанов. – М.: Наука, 1978. – 136 с
3. María José Cernadas, María Teresa Martínez, Elena Corredoira & María del Carmen San José. Conservation of holm oak (*Quercus ilex*) by *in vitro* culture. *Mediterranean Botany*, 2018, pp. 97-104.
4. Qiansheng Li, Mengmeng Gu, Min Deng. *In Vitro* Propagation of Oriental White Oak *Quercus aliena* Blume. *Forests*, 2019.
5. Andrea N. Brennan, Valerie C. Pence, Matthew D. Taylor, Brian W. Trader, Murphy Westwood. Tissue Culture Using Mature Material for the Conservation of Oaks. *HortTechnology*, 2017, pp. 644-649.



ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ГЕОМЕТРИЧЕСКОЙ МОРФОМЕТРИИ В ИЗУЧЕНИИ
ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ *CAUCASOTACHEA VINDOBONENSIS*
(MOLLUSCA, GASTROPODA, PULMONATA)

Тищенко А.Ю., Юсупов С.Р., Снегин Э.А.

ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский
университет», Белгород, Россия

sacha10-05@mail.ru

Морфологическая изменчивость в природных популяциях брюхоногих моллюсков является часто наблюдаемым явлением. Особенно это касается изменчивости конхиологических признаков, которые в основном оценивают путем применения методов классической морфометрии, в то же время геометрическая морфометрия может стать дополнительным инструментом изучения изменчивости.

Наземный брюхоногий моллюск *Caucasotachea vindobonensis* (Fér.) является удобным модельным объектом изучения. На территории Белгородской области проходит северо-восточная граница естественного ареала данного вида.

Моллюски были собраны в 2020-2021 году в 5 пунктах Белгородской области (Россия): 1 – Головчино (50.522428 с.ш., 35.805632 в.д.), 2 – Никитовка (50.377783 с.ш., 38.395973 в.д.), 3. – Белгород, р. Везелка (50.584903 с.ш., 36.609735 в.д.), 4 – Яблоново (50.132246 с.ш., 38.003451 в.д.), 5 – Белгород, р. Северский Донец (50.597956 с.ш., 36.617351 в.д.). Для анализа использовали только половозрелых особей, образовавших отворот устья. Из каждой популяции по 20 раковин были сфотографированы в одном ракурсе и в одном масштабе. С помощью программ tpsUtil и tpsDig 2.0. (Rohlf, 2004) было расставлено 12 ландмарок. Переменные формы оценивали путем выравнивания исходных координат образцов путем обобщенного прокрустового анализа. Все расчеты были проведены в программе PAST v 4.09.

По результатам анализа главных компонент (PCA) установлена схожесть всех исследуемых популяций, что проявлялось в формировании перекрывающихся массивов на PCA-плоте, в то же время для популяции №1 был характерен относительно обособленный кластер. Для определения степени сходства популяций проводили анализ MANOVA первых 4-х компонент. Суммарно эти компоненты вносили 80% изменчивости (32%, 25%, 14% и 9% соответственно). В результате были обнаружены достоверные отличия между исследуемыми популяциями ($P < 0,01$), за исключением популяции №2 и №4, что, возможно, связано со сходными условиями обитания этих групп: биотопы обоих участков представляют собой меловые склоны с разнотравной растительностью.

Наряду с анализом формы была рассмотрена изменчивость размера центроида (CS), который описывает метрическую составляющую изменчивости. Проведенный анализ ANOVA CS не показал достоверных отличий между исследуемыми группами ($F=2,06$; $P=0,09$). Полученные результаты могут указывать на то, что вклад, вносимый изменчивостью формы, более существенный, чем вклад, вносимый изменениями общего размера раковины.

Таким образом, методы геометрической морфометрии могут оказаться полезными дополнительными инструментами в изучении внутривидовой изменчивости.



ВЛИЯНИЕ СУММАРНОЙ АВТОТРАНСПОРТНОЙ НАГРУЗКИ НА МУЖСКУЮ ГЕНЕРАТИВНУЮ СФЕРУ ЕЛИ КАНАДСКОЙ В ВОРОНЕЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Чугреев М.Ю.

ФГБУ Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и
биотехнологии, Воронеж, Россия

michael.yurievich@yandex.ru

Ель канадская (*Picea glauca* (Moench) Voss) – один из интродуцированных видов хвойных, нашедших широкое применение в озеленении городов, в том числе Воронежа. Хотя деревья данного вида считаются довольно устойчивым к различным стрессовым факторам города, произрастание в условиях техногенного загрязнения может негативно сказаться на их состоянии. Особенно чувствительной являются генеративные структуры. Поэтому важным аспектом изучения данного вида является оценка влияния техногенного загрязнения на состояние его генеративной сферы.

Приведены результаты изучения воздействия такого техногенного источника экологического риска, как суммарная автотранспортная нагрузка, на состояние мужской генеративной сферы ели канадской в городе Воронеже и Воронежской области.

В 2021 году проведены фенологические наблюдения, оценена интенсивность образования мужских стробиллов, а также определена жизнеспособность пыльцы деревьев ели канадской, произрастающих в 6 различающихся по уровню суммарной автотранспортной нагрузки точках: №1 – за городом, в Семилукском коллекционно-маточном дендрарии (КМД); №2 – на территории Экспериментально-показательного дендрария (ЭПД) ВНИИЛГИСбиотех, при суммарной автотранспортной нагрузке менее 1000 авт./час на 1 кв. км; №3 – в прилегающем к ЭПД лесопарковом участке (нагрузка в пределах 1000-1500 авт./час на 1 кв. км); №4 – на Московском проспекте (1500-2000 авт./час на 1 кв. км); №5 – на Никитинской улице (2500-3000 авт./час на 1 кв. км); №6 – на Средне-Московской улице (более 3000 авт./час на 1 кв. км).

Пыление ели канадской в 2021 году началось в Воронеже довольно поздно – 4 мая, в КМД – 6 мая и продолжалось около 3-5 дней. На первые дни пришлась ясная погода без осадков, но с 7 мая начались кратковременные дожди. Интенсивность пыления можно оценить на 5 баллов у дерева №1, на 4 балла – у второго, на 3 балла – у третьего. В городских условиях дерево №4 пылило на 3, №6 – на 2 балла, а у дерева №5 встретились лишь единичные стробиллы.

Жизнеспособность изученных деревьев в 2021 году была высокой, но несколько варьировала (от $71,2 \pm 7,0$ до $90,1 \pm 5,0\%$), а однофакторный дисперсионный анализ показал наличие достоверных различий в качестве пыльцы из различных местопроизрастаний ($P=1,2 \cdot 10^{-12}$). Таким образом, техногенные источники экологического риска, в частности суммарная автотранспортная нагрузка, могут оказывать значимое влияние на состояние мужской генеративной сферы ели канадской.



СРАВНЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ХЕМОРЕЦЕПТОРОВ БАЙКАЛЬСКИХ ГЛУБОКОВОДНЫХ И ЛИТОРАЛЬНЫХ АМФИПОД

Широкова Ю.А.¹, Мадьярова Е.В.^{1,2}, Шатилина Ж.М.^{1,2}, Тимофеев М.А.^{1,2}

¹НИИ биологии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», Иркутск, Россия;

²Байкальский исследовательский центр, Иркутск, Россия

yuliashirokova2501@gmail.com

В озере Байкал обитает единственная в мире глубоководная пресноводная фауна амфипод. За счет дефицита источников пищи на больших глубинах у глубоководных некрофагов рода *Ommatogammarus* могла сформироваться высокочувствительная система обонятельных хеморецепторов, способных детектировать пищевой объект на большом расстоянии. Целью исследования было проведение сравнительного морфологического анализа хеморецепторов у байкальских глубоководных и литоральных амфипод.

Морфологию хеморецепторов на первой паре антенн исследовали у литоральных амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* и *Eulimnogammarus vittatus* и у глубоководных амфипод *Ommatogammarus carneolus melanophthalmus*, *Ommatogammarus flavus* и *Ommatogammarus albinus*. Антенны байкальских амфипод обсушивали, после чего производили их покрытие платиной. Подготовленные образцы анализировали на сканирующем электронном микроскопе.

У всех исследованных амфипод обонятельные хеморецепторы (эстетаски) находились в окружении коротких щетинок. У литоральных видов *E. verrucosus* и *E. vittatus*, а также у глубоководного *O. carneolus melanophthalmus* было только по одному эстетаску на одном сегменте антеннул. У глубоководных амфипод *O. flavus* были обнаружены парные эстетаски. У *O. albinus* насчитывали до трех эстетасков на сегмент из 5-6 возможных у данного вида.

Во внешнем строении обонятельных хеморецепторов литоральных *E. verrucosus* и глубоководных *O. carneolus melanophthalmus* отмечали разделение на более прямой гладкий стебелек и на сморщенную заостренную головку. Сморщивание головок у обонятельных хеморецепторов может свидетельствовать о том, что в верхней части эстетасков находится более тонкая кутикула, проницаемая для молекул запахов. У *E. verrucosus* длина головки была примерно в два раза больше длины стебелька, а у *O. carneolus melanophthalmus* длина головки эстетаска превосходила длину стебелька в 2-3 раза. У литоральных амфипод *E. vittatus* не было выявлено четкого перехода между стебельком и головкой эстетасков. Разделение на стебелек и головку было слабо различимо у эстетасков *O. flavus* и *O. albinus*. При этом головка эстетаска у данных видов была примерно в 4 раза длиннее стебелька.

Таким образом, у байкальских глубоководных амфипод-некрофагов *O. flavus* и *O. albinus* система обонятельной хеморецепции более развита по сравнению с литоральными видами.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке гранта РФФ 20-64-46003.



РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА МОНИТОРИНГА РУКОКРЫЛЫХ НА ЗИМОВКАХ В 2016-2021 гг. В ШТОЛЬНЯХ ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

Щеховский Е.А.¹, Абдульманова Д.И.², Кустикова М.А.¹

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО»,
Санкт-Петербург, Россия;

²Российский государственный педагогический университет им. А.И. Герцена,
Санкт-Петербург, Россия

shchekhovskii@mail.ru

На территории Ленинградской области на зимовку остаются 7 видов отряда рукокрылых *Chiroptera*, принадлежащих к одному семейству гладконосых летучих мышей *Vespertilionidae*: прудовая ночница, *Myotis dasycneme* (Voie, 1825), водяная ночница, *Myotis daubentoni* (Kuhl, 1817), ночница Наттерера, *Myotis nattereri* (Kuhl, 1817), ночница Брандта, *Myotis brandtii* (Eversmann, 1845), усатая ночница, *Myotis mystacinus* (Kuhl, 1817), бурый ушан, *Plecotus auritus* (Linnaeus, 1758), северный кожанок, *Eptesicus nilssonii* (Keyserling & Blasius, 1839).

В исследовании представлены результаты анализа последних пяти лет мониторинга рукокрылых на зимовках в штольнях Ленинградской области в рамках работ по мониторингу рукокрылых с 2010 года, где для многих из них существуют оптимальные микроклиматические условия. Из-за морфологического сходства усатых ночниц и ночниц Брандта все учтенные особи были отмечены как ночница Брандта.

Сбор материала был проведён в период зимовок с 2016/2017 до 2020/2021 годов. Учёт проводился методом прямого наблюдения с осени по весну каждого года зимовки. За эти годы численность рукокрылых, использующих штольни в качестве зимнего убежища, возросла в 1,5 раза. По результатам 2020/2021 года было обнаружено 3689 особей зимующих видов. Большинство особей составляют прудовые ночницы – 44,3%, из которых 97,7% отмечено в штольне «Танечкина». За последние пять лет отмечен рост числа особей водяных ночниц в 2,5 раза, ночниц Брандта в 3,5 раза и ночниц Наттерера в 1,5 раза в штольнях Староладожского и Саблинского комплексов. Колебания других видов в численности незначительны. Бурые ушаны, которые в XX веке составляли до 70% всех особей на зимовках, сейчас в находках составляли около 5%. Особи северных кожанков встречались единично.

В заключение можно судить об общей тенденции повышения численности рукокрылых на зимовках в штольнях. Особенно это заметно в штольне «Левобережная» Саблинского комплекса, находящейся под круглогодичной охраной, и штольне «Танечкина» Староладожского комплекса, в которой подземное озеро заполняет её площадь от 50 до 80% в зависимости от сезона, выполняя функцию барьера для посетителей и снижая фактор беспокойства в период зимовки. Помимо этого отмечается снижение численности особей всех видов в штольнях наиболее доступных и часто посещаемых людьми в период зимовки. Наиболее ярко выражена эта особенность в Борщевских штольнях и штольнях «Штаны», «Жемчужная», «Графский грот», «Верёвка» и «Пляжная» из Саблинского комплекса штолен.



ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛИХЕНОФЛОРЫ СКАЛЬНЫХ ОБНАЖЕНИЙ РЕКИ ЧУСОВАЯ

Щипанова Е.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

ekandr.sh@yandex.ru

Флора долины реки Чусовой всегда привлекала внимание исследователей. На известняковых прибрежных скалах активно идут карстовые процессы, что приводит к возникновению многочисленных гротов, выемок, навесов – это расширяет спектр экологических условий и, следовательно, видовое разнообразие лишайников.

Территория Пермского края в долине Чусовой до недавнего времени оставалась относительно слабо изученной лишайниками. Проблеме сохранения биологического разнообразия, в том числе лишайников, на сегодняшний день уделяется всё больше внимания. На современном этапе планомерное и целенаправленное изучение лишайнофлоры ведется на базе кафедры биологии и географии ПГГПУ. Сотрудниками и студентами кафедры выполнен цикл работ посвященных мониторингу охраняемых видов, скальных останцов и курумников в горах, береговых скальных выходов на реках.

Изучение видового состава лишайников скальных обнажений в долине реки Чусовая было начато в 2017 г. Сборы проводились в долине реки Чусовая на участке от села Кын до города Чусового. Видовая идентификация проводилась по общепринятым методикам с использованием стандартной техники микроскопирования и химических реактивов. Информация об образцах внесена в базу данных «Лишайники Урала», образцы хранятся в лишайнологическом гербарии кафедры ботаники ПГГПУ (РПУ).

Таксономический состав и систематическая структура являются базовыми характеристиками флоры, однако при проведении анализа лишайнофлоры существуют некоторые спорные вопросы. При всей необходимости таксономического анализа его интерпретация не всегда однозначна из-за нестабильности представлений об объеме таксонов. Несмотря на это, таксономические принципы лежат в основе сравнения лишайнофлор отдельных территорий.

В проанализированных образцах выявлено 158 видов лишайников. Все лишайники относятся к отделу *Ascomycota*, 5 классам (*Arthoniomycetes*, *Candelariomycetes*, *Eurotiomycetes*, *Lecanoromycetes*, *Lichinomycetes*), 8 подклассам, 16 порядкам, 33 семействам, 72 родам. Основу таксономического состава лишайников составляют представители класса *Lecanoromycetes*.

Самым крупным по числу видов является семейство *Cladoniaceae* (18 видов, 11,4% от флоры). Второе место занимает семейство *Lecanoraceae* (16 видов, 10%). Семейство *Teloschistaceae* является третьим по числу видов (12 видов, 7,6%). Наиболее богатым по видовому составу является род *Cladonia* – 18 видов (11,4%), *Peltigera* – 10 видов (6,33%), *Lecanora* – 8 (5,06%).



БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ *GLUCONOBACTER OXYDANS* ВКМ В-1280 ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ

Юдина Н.Ю., Богачихин Д.А., Алферов С.В.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

TSUnewIT@gmail.com

Загрязнение окружающей среды вызывает озабоченность во всем мире из-за растущего перечня токсикантов (органические вещества, тяжелые металлы, пестициды, гербициды и т.д.). Использование показателя биотоксичности имеет особое значение для обнаружения неизвестных токсикантов и компенсирует дефицит физико-химических показателей. Большинство коммерческих систем для мониторинга биотоксичности основано на применение биOLUMИнесцентных микроорганизмов. В связи с этим уделяется большое внимание разработке удобных и эффективных медиаторных биосенсоров низкой стоимости, позволяющих использовать большое количество индивидуальных микроорганизмов и формировать биорецепторы на основе консорциумов, чувствительных как к органическим токсикантам, так и к тяжелым металлам, в отличие от биOLUMИнесцентных бактерий. Поэтому целью данной работы является разработка биосенсорной системы медиаторного типа на основе бактерий *Gluconobacter oxydans* ВКМ В-1280 для оценки токсичности.

Основой медиаторного биосенсора является угольно-пастовый электрод с ферроценом и адсорбированной суспензией бактерий *G. oxydans*. Измерения производили при постоянном потенциале 250 мВ относительно хлорсеребряного электрода на потенциостате Corrtest CS350. Для оценки токсичности в кювету с фосфатным буфером последовательно вносили растворов токсикантов и глюкозы (концентрация в кювете 0,5 ммоль/л) и ожидали завершения изменения силы тока. Для количественной оценки эффектов концентрацию, вызывающую % ингибирования (например, 50%), определяли как EC_x (например, EC_{50}). Для анализируемых токсикантов (метанол, п-нитрофенол, Cd^{2+} , Cr^{6+}) значение EC_{50} сопоставимо с люминисцентным биосенсором «Биотокс-10М», что позволяет использовать разрабатываемый биосенсор для оценки токсичности.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021-0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Литература.

Юдина Н.Ю., Зайцев М.Г., Арляпов В.А., Алферов В.А. и др. Биосенсор для экспресс-оценки интегральной токсичности товаров из полимерных и текстильных материалов // Биотехнология. – 2021. – Т. 37. – №. 6. – с. 119-128.

Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Turovskaya A.D., et al. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity. *Enzyme Microb. Technol.*, 2020, 132, 109435.



ПОЧВОВЕДЕНИЕ

ПРОСТРАНСТВЕННОЕ ВАРИИРОВАНИЕ МАКРОСКОПИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ УГЛЯ В ТОРФЯНЫХ ПОЧВАХ СРЕДНЕЙ ТАЙГИ РЕСПУБЛИКИ КОМИ (НА ПРИМЕРЕ ОДНОГО БОЛОТНОГО МАССИВА)

Горбач Н.М.^{1,2}, Старцев В.В.¹, Дымов А.А.^{1,2}

¹Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения
Российской академии наук, Сыктывкар, Россия;

²Сыктывкарский государственный университет имени Питирима Сорокина,
Сыктывкар, Россия

nikolay.tbo@gmail.com

Торфяные олиготрофные почвы (почвы верховых болот) являются уникальными архивами, хранящими информацию об экологических изменениях, поэтому подходят для изучения истории прошедших пожаров. В настоящее время особую актуальность приобретают исследования, связанные с изучением после пожарных углистых включений, как стабильных форм углерода в торфяных почвах. Несмотря на вышесказанное, имеющиеся в литературе работы не оценивают пространственное варьирование данных о прошедших пожарах в границах одного болотного массива. Цель данной работы заключалась в сравнении данных о содержании макроскопических частиц угля в торфяных олиготрофных почвах на примере одного болота.

Объекты исследования расположены в средней тайге на Северо-Востоке Европейской части России (Республика Коми, бол. Язель). Данные по пожарам были получены по результатам исследования содержания макроскопических частиц угля и данным радиоуглеродного датирования. В рамках исследования было отобрано три торфяные колонки с болота площадью ~660 га (в центральной, западной и в восточной частях болотного массива).

Впервые проведены исследования пространственного варьирования данных о пройденных пожарах в голоцене в границах одного болотного массива в Республике Коми. В результате исследований по данным каждой из колонок реконструирована динамика пожаров, следы которых сохранились в исследуемых болотах. Колонка, отобранная в западной части глубиной в 148 см, датируется возрастом 6206 ± 180 кал. л. Колонка в восточной части глубиной 204 см, датируется возрастом 4521 ± 150 кал. л. Колонка, отобранная в центральной части болотного массива глубиной в 306 см, датируется возрастом в 9481 ± 150 кал. л. Колонки, отобранные с восточной и западной частей, по сравнению с колонкой из центральной части, содержат усеченную информацию о генезисе и развитии исследуемого болотного массива, включая данные о пройденных пожарах, но предоставляют дополнительную информацию о близких к современному этапам голоцена. Колонка с центральной части болотного массива содержит наиболее полную информацию о генезисе и развитии болота, что позволяет получить более полную информацию о пройденных пожарах.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-29-05111 мк.



ПРИМЕНЕНИЕ ПРОДУКТОВ ОБОГАЩЕНИЯ ОТХОДОВ ДОБЫЧИ ФЛОГОПИТА ДЛЯ ФИТОРЕМЕДИАЦИИ ТЕХНОГЕННОЙ ПУСТОШИ В СУБАРКТИКЕ

Петрова А.Г.², Слуковская М.В.¹, Марковская Е.Ф.²

¹Кольский Научный центр Российской академии наук, Апатиты, Россия;

²Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

petrova_anna93@mail.ru

Добыча и переработка многих полезных ископаемых неизбежно связана с образованием и складированием отходов производств, а также зачастую приводит к загрязнению ландшафтов вследствие атмосферных выбросов предприятий. Минералогические и химические особенности серпентинсодержащих горнопромышленных отходов позволяют использовать их для сорбции тяжелых металлов. В экспериментах использовались материалы, полученные при гравитационном обогащении отходов добычи флогопита: (1) зернистый вермикулит-лизардитовый продукт с содержанием лизардита 31% и вермикулита 33%, (2) зернистый продукт, обожженный в муфельной печи при 700°C, и (3) хвосты обогащения, состоящие преимущественно из пироксенов с содержанием лизардита 7%, вермикулита 2%. В камеральном эксперименте изучена продуктивность растений при различных объемных соотношениях между органической (загрязненный торф) и минеральной частями почвосмесей. По мере увеличения доли материала отмечено увеличение рН в вариантах от 25% до 75% минерального материала. Содержание минеральных материалов в почвосмеси обеспечивало увеличение фотосинтетической активности, улучшение работы светособирающего комплекса фотосистемы II за счет роста содержания хлорофилла b и каротиноидов. Увеличение концентрации вносимых отходов приводило к сдвигу рН субстратов в щелочной диапазон (рН_{вод} от 3.72 до 8.61; рН_{KCl} до 8.47).

В полевом эксперименте на техногенной пустоши заложены пробные площадки с содержанием материалов (1) и (3) 25, 50, 75 и 100%, материала (2) – 1, 5 и 10%. Исходно почва вблизи комбината характеризуется кислой реакцией, валовым содержанием Cu 2344 мг/кг, Ni – 5955 мг/кг, содержанием подвижных Cu – 440 мг/кг, Ni – 3200 мг/кг. С увеличением концентрации минеральных материалов происходило пропорциональное увеличение рН и снижение подвижной фракции Cu и Ni на 1-2 порядка по сравнению с торфяной почвой. Результаты 2-3 вегетационного сезона показали, что максимальные средние значения эмиссии соответствовали серии с вермикулит-лизардитом с долей 50-100% (138-247 мгС·м⁻²·час⁻¹). В то же время варианты с пироксеном (50%) и термоактивированным вермикулит-лизардитом (10%) имели значения эмиссий, сопоставимые с вариантом с 25% вермикулит-лизардита (102-109 мгС·м⁻²·час⁻¹). Наиболее благоприятными для функционирования растений являлись варианты с долей минерального материала выше 50%.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-77-10111.



АКТИВНОСТЬ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ ПОЧВ И КУЛЬТУРНЫХ СЛОЕВ
АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ПАМЯТНИКОВ БАССЕЙНА ОЗ. СЕВАН
(РЕСПУБЛИКА АРМЕНИЯ)

Петросян А.А.

Институт физико-химически и биологических проблем почвоведения Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

Alisa_mayakovskaya@bk.ru

В культурных слоях древних поселений микробное сообщество хранит информацию о характере антропогенного освоения территории. Биологические методы исследования палеопочв и культурных слоев позволяют нам широко изучить и реконструировать специфику жизни археологических обществ, изучая культурные слои, сохраняющие следы деятельности древнего населения. Цель настоящей работы заключается в выявлении профильной и временной изменчивости микробной биомассы современных почв и культурных слоев археологического памятника бассейна оз. Севан (Республика Армения)

Объектами исследования стали: археологический памятник Сотк-2 эпохи бронзы и РЖВ на территории Республики Армения (село Сотк Гехаркуникской области); природный парк Артаниш на полуострове Артаниш (бассейн озера Севан). На памятнике Сотк-2 были исследованы три разреза культурного слоя, в природном парке Артаниш заложен почвенный разрез на выравненном участке у подножья горы Артаниш, и две прикопки на склонах северной и южной экспозиции. Получены данные по содержанию органического углерода и минерального фосфора, фосфатазой и уреазной активности, оценке микробной биомассы по содержанию почвенных фосфолипидов с пересчетом полученных величин в единицы микробного углерода.

Такие показатели как С-ФЛ, S_{org} , фосфатазная и уреазная активность демонстрировали снижение показателей вниз с глубиной. На глубине 60-80 констатируем увеличение значений в два раза в микробной биомассе, относительно современных показателей. Здесь же отмечено небольшое увеличение содержания органического углерода по сравнению с предыдущим слоем. Также минеральный и органический фосфор сильно варьировали по всему профилю в 1 и 3 разрезе. Это связано с деятельностью древнего человека и хорошо демонстрирует несколько этапов заселения объекта. По результатам статистического анализа методом главных компонент на поселении Сотк в северо-восточной части сохранились культурные слои с высоким содержанием органического и минерального фосфора, органического углерода и микробной биомассы. В юго-восточной и северо-западной части культурные слои были преобразованы в процессе современного почвообразования и по свойствам были близки к современной почве, расположенной в 50 км от поселения Сотк в бассейне оз. Севан на территории природного парка Артаниш.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-59-05001.



ВЛИЯНИЕ СОЛОНЦОВОГО ПРОЦЕССА НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СТЕПНЫХ ПАСТБИЩНЫХ ПОЧВ

Юршенас Д.А.

Институт физико-химически и биологических проблем почвоведения Российской академии
наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушчино, Россия

dashayurshenas32@gmail.com

Целью нашего исследования была оценка влияния солонцового процесса на биологическую активность степных пастбищных почв. Для этого мы оценивали микробную биомассу почв по интенсивности субстрат-индуцированного дыхания и определяли численность эколого-трофических групп микробных сообществ на твердых питательных средах.

Объектами исследования были пастбищные каштановые почвы и солонцы Ремонтненского района Ростовской области. На участке в 800 м от овцеводческой фермы закладывалась траншея, в которой был исследован следующий ряд: почвы каштановая несолонцеватая, каштановая солонцеватая, солонцы глубокий, средний, мелкий, корковый.

Микробная биомасса в верхних горизонтах каштановых почв, включая гумусовый горизонт, сформированный на поверхности солонца глубокого, была существенно выше, чем в надсолонцовых горизонтах, за исключением солонца коркового. В ряду солонцов микробная биомасса увеличивалась от солонца глубокого до солонца коркового, где значение этого показателя было максимальным. В иллювиальном горизонте каштановых почв микробная биомасса была в 3.5 – 4 раза выше, чем в иллювиальном горизонте солонцов.

Численность олиготрофных микроорганизмов в верхнем горизонте почв траншеи различалась недостоверно, несмотря на очевидное различие морфологических свойств. Иллювиальный горизонт, в целом, характеризовался увеличением численности олиготрофных микроорганизмов по мере развития солонцового процесса.

Численность копиотрофных микроорганизмов увеличивалась в верхнем горизонте в ряду от светло-каштановой несолонцеватой почвы до солонца мелкого, где наблюдалось максимальное значение данного показателя. В верхних горизонтах остальных солонцов численность копиотрофных микроорганизмов была сходна. В иллювиальном горизонте увеличение численности копиотрофных микроорганизмов наблюдалось по всему ряду, по мере развития солонцового процесса.

Таким образом, в солонцовом комплексе пастбища Ремонтненского района Ростовской области были выявлены неоднородные изменения биологической активности в ряду светло-каштановая несолонцеватая почва – корковый солонец. Наиболее высокими биологическими показателями характеризовались солонцы корковый и мелкий, что может быть связано с концентрацией микробного сообщества в их верхних горизонтах, характеризующихся малой мощностью, а также приуроченностью солонцов к микрозападинам. Высокие показатели биологической активности солонцов позволяют сделать вывод об умеренной интенсивности выпаса на данном участке пастбища.



ПОЧВЕННАЯ МИКРОФЛОРА РУССКО-БУЙЛОВСКОГО ПЕСЧАНОГО КАРЬЕРА

Кривчикова Д.М.¹, Каширская Н.Н.²

¹Муниципальное казенное общеобразовательное учреждение
Русско-Буйловская средняя школа, Русская Буйловка, Россия;

²Институт физико-химически и биологических проблем почвоведения Российской академии
наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

Krivchikova_02@mail.ru

Рекультивация заброшенных песчаных карьеров приводит к ускорению зарастания нарушенных территорий. Этот процесс, сопровождающийся формированием молодых почв – эмбриоземов, происходит сейчас на территории Русско-Буйловского песчаного карьера, где интенсивная добыча песка проводилась в 2017 г. для дорожного строительства. В центральной части карьера, в непосредственной близости от рекультивационной насыпи, сформированной преимущественно из верхних плодородных почвенных слоев, располагается выход грунтовых вод. В окрестностях этого водоема произрастают луговые травы. Поверхность насыпи покрыта преимущественно сорной растительностью, характерной для нарушенных местообитаний. Здесь нередко встречаются куртинки злаков. На пустынной песчаной территории к востоку от насыпи растут немногочисленные кусты холмовой солянки. Под склонами карьера, где песок обогащается почвенно-грунтовым материалом засыпки, встречаются сорные травы и злаки. Таким образом, дно песчаного карьера демонстрирует разнообразие пионерной растительности на участках с различной степенью обогащения рекультивационным грунтом.

Известно, что накопление органического углерода в почвах может сопровождаться увеличением численности микроскопических грибов. Целью нашей работы было оценить соотношение численности колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий и грибов, растущих на почвенном агаре, в эмбриоземах Русско-Буйловского песчаного карьера. Для сравнительного анализа микробиологических показателей нами были отобраны образцы верхнего слоя залежных почв в окрестностях карьера, на участках с травянистой и древесной растительностью.

У подножия склона карьера суммарная численность грибов и бактерий достигала 70 млн. КОЕ / г почвы, а доля грибов составляла более 40%. Пустынные площади карьера, занятые солянкой, характеризовались значительным уменьшением суммарной численности микроорганизмов, при этом доля грибов увеличивалась на сухих участках и снижалась в микропонижениях с повышенной влажностью почвы. Минимальная численность грибов и максимальная численность бактерий были выявлены в окрестностях водоема. Здесь низкая доля грибов также была обусловлена высокой влажностью почвы.

Эмбриоземы, в большей части случаев, демонстрировали повышенные значения суммарной численности микроорганизмов, по сравнению с залежными почвами в окрестностях карьера. Максимальная доля грибов (около 70% от суммарной численности КОЕ грибов и бактерий) как в эмбриоземах, так и в залежных почвах, была обнаружена под дикорастущими злаками.

Работа рекомендована Каширской Т.П., учителем химии и биологии МКОУ СОШ Русско-Буйловская.



ТЕРМОФИЛЬНЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ В ЗАЛЕЖНЫХ ПОЧВАХ ЗАБРОШЕННОЙ УСАДЬБЫ СЕЛА РУССКАЯ БУЙЛОВКА

Челнакова У.Е.¹, Каширская Н.Н.²

¹Муниципальное казенное общеобразовательное учреждение
Русско-Буйловская средняя школа, Русская Буйловка, Россия;

²Институт физико-химически и биологических проблем почвоведения Российской академии
наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

ulianatchelnakova@yandex.ru

Известно, что источниками термофильных микроорганизмов в почвах являются навоз и компост – субстраты, используемые в качестве удобрений и способные к саморазогреванию. Обилие термофильных микроорганизмов в почвах древних сельскохозяйственных полей свидетельствует о применении органических удобрений в прошлом, что подтверждается исследованиями термофильной микрофлоры в современных удобряемых почвах. Целью нашей работы было оценить численность почвенных термофильных микроорганизмов на различных участках традиционного сельского домовладения, заброшенного около 20 лет назад.

Усадьба располагается на юго-восточной окраине села Русская Буйловка, на краю пологой балки, поросшей сосновым лесом. Известно, что на территории этой усадьбы хозяйственный уклад практически не изменялся на протяжении нескольких веков, оставаясь идеальной моделью традиционного крестьянского домовладения до начала XXI столетия. Образцы почв отбирались из верхних слоев 0 – 10 см на участках около дома и хозяйственных построек. Территория сада и огорода исследовалась вдоль трансекты, через каждые 10 шагов по направлению на восток. Численность колониеобразующих единиц (КОЕ) термофильных микроорганизмов в почвенных образцах оценивалась методом подсчета колоний на глюкозо-пептонно-дрожжевой среде, после инкубации в течение 3 суток при 60 °С.

Максимальное обилие термофильных микроорганизмов – 525.5 тыс. КОЕ / г почвы – было выявлено в саду перед фасадом жилого дома на западной стороне усадьбы. Участки в непосредственной близости от хозяйственных построек различного назначения характеризовались на порядок меньшими величинами численности термофилов. На восточной стороне, вблизи основной хозяйственной постройки, включающей погреб, времянку, мастерскую и хранилище для угля, термофилы не были обнаружены. По-видимому, скот не допускался на этот участок двора. В саду, расположенном между восточной стеной жилого дома и остатками деревянной ограды в 40 шагах от дома, численность термофилов, составляющая в среднем около 150 тыс. КОЕ / г почвы, была в 10 – 30 раз больше, чем на ближних участках огорода, расположенных в 50 – 70 шагах от дома. Дальние участки огорода, как мы полагаем, или совсем не удобрялись, или давно перестали удобряться. Термофильный след здесь практически не сохранился. За границей огорода, в залежных почвах колхозного картофельного поля, термофилы присутствовали. Их численность в этой зоне была в 1.5 раза выше, чем на удобряемых участках огорода.

Работа рекомендована Каширской Т.П., учителем химии и биологии МКОУ СОШ Русско-Буйловская.



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЧВ И КУЛЬТУРНЫХ СЛОЕВ АРХЕОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ДОНСКОГО ПРАВОБЕРЕЖЬЯ

Шевченко П.Г.¹, Каширская Н.Н.²

¹Муниципальное казенное общеобразовательное учреждение
Русско-Буйловская средняя школа, Русская Буйловка, Россия;

²Институт физико-химически и биологических проблем почвоведения Российской академии
наук – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

tnsh77@mail.ru

В последние десятилетия, многие заброшенные села Подгоренского района на правом берегу реки Дон приобретают статус археологических объектов. Целью нашей работы были микробиологические исследования почв и культурных слоев этого края. Район исследования замечательно охарактеризован в полевых дневниках выдающегося советского ландшафтоведа Федора Николаевича Милькова: «По дороге неоднократно наблюдаем меловые склоны и обрывы, едва прикрытые растительностью, в числе которой – тимьян, норичник меловой и др. Берег рассечен балками и оврагами, на некоторых обрывах встречаются формы размыва и выветривания, напоминающие дивы... Деревня Украинская Буйловка расположена на крутом меловом склоне Дона. Граниты выходят непосредственно у села... Дон в этом месте производит впечатление многоводной реки».

Образцы почвы были отобраны на территории Украинской Буйловки – в зарослях акации около храма Архангела Михаила и во дворе заброшенной сельской усадьбы; в окрестностях Белогорского монастыря у поклонного креста; на берегу реки Дон у подножия Буй-Камня – известного геологического памятника природы Воронежской области. Все эти объекты были связаны с поселенческой или туристической деятельностью человека. В качестве контроля были взяты образцы естественных почв в пойменном лесу и на берегу Дона.

Посев почвенных микроорганизмов на твердые питательные среды проводился в школьной лаборатории МКОУ Русско-Буйловская СОШ. Колонии сапротрофных бактерий, связанных с деятельностью человека, учитывались на глюкозо-пептонно-дрожжевой среде, а колонии олиготрофных бактерий – на почвенном агаре. Стерильные чашки Петри с питательными средами были получены из Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН.

В верхнем горизонте наибольшая численность микроорганизмов, с преобладанием олиготрофных бактерий, наблюдалась в почве пойменного леса. В почвах туристических объектов, отобранных с речного дна (Буй-Камень), среди древесной растительности (Храм Архангела Михаила) и в пределах степного ландшафта (Поклонный Крест) численность сапротрофов снижалась в 1.5 – 4 раза, а численность олиготрофов – в 2 – 5 раз по сравнению с почвой пойменного леса. С глубиной общая численность микроорганизмов заметно уменьшалась, при этом увеличивалась доля сапротрофных бактерий. Наибольшее увеличение их доли было отмечено в нижнем горизонте речного грунта у подножия Буй-Камня, а также в культурном слое заброшенной усадьбы.

Работа рекомендована Каширской Т.П., учителем химии и биологии МКОУ СОШ Русско-Буйловская.



БИОФАРМАЦЕВТИКА

ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОПЕРОКСИДАЗНОГО ОКРАШИВАНИЯ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ ВТОРОГО ТИПА (PCV-2) НА КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК РК-15

Азимов К.А.

ФГБНУ ВНИТИБП, Щёлково, Россия

icosaedr@mail.ru

Данное исследование посвящено разработке метода иммунопероксидазного окрашивания культуры клеток РК-15, заражённой цирковирусом свиней второго типа (PCV-2), с целью определения наличия вируса либо его концентрации при использовании метода вирусного титрования. Цирковирусная инфекция свиней, вызываемая вирусом PCV-2, представляет собой важное для сельского хозяйства иммуносупрессионное заболевание, поражающее иммунокомпетентные клетки и, вкуче с такими развивающимися на его фоне инфекциями, как парвовирусная инфекция, репродуктивно-респираторный синдром, свиной грипп и другие, имеющая значительные негативные экономические эффекты для российского свиноводства. Борьба с этим заболеванием подразумевает обязательное наличие соответствующего цитохимического теста, позволяющего определять присутствие вирусного антигена в клетках. Наиболее специфичным и чувствительным тестом представляется иммунопероксидазное окрашивание, методика которого для цирковируса свиней второго типа в настоящее время отсутствует в РФ. Суть разработанного метода заключается в последовательном инфицировании культуры клеток РК-15, её фиксации с применением 1-4% раствора забуференного параформальдегида и пермеабиллизации с использованием нонидента (NP-40) с последующим нанесением поликлональных специфических антител к PCV-2 и добавления связывающегося с ними конъюгата, содержащего в своём составе пероксидазу хрена. Дальнейшее осуществление пероксидазой своей энзиматической активности в присутствии 3-амино-9-этилкарбазола приводит к возникновению красного окрашивания (тёмно-коричневого окрашивания в случае использования 3,3-диаминобензидина) в области наличия пероксидазы, позволяя таким образом выявлять поражённые цирковирусом второго типа участки клеток. Разработанный метод может применяться для обнаружения антигенов PCV-2 в ветеринарных клиниках и научно-исследовательских институтах.



ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО АГОНИСТА
РЕЦЕПТОРА ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА ДЛЯ СНИЖЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОЙ
ДОЗЫ ГОНАДОТРОПИНА ПРИ ЛЕЧЕНИИ АНДРОГЕННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У
САМЦОВ КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 ТИПА

**Бахтюков А.А.¹, Степочкина А.М.¹, Деркач К.В.¹, Сорокоумов В.Н.²,
Лебедев И.А.¹, Шпаков А.О.¹**

¹ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета,
Санкт-Петербург, Россия

bahtyukov@gmail.com

Сахарный диабет 1 типа (СД1) приводит к нарушению метаболизма и множества физиологических функций, в том числе негативно влияет на мужскую репродуктивную систему. Мощным триггером этого являются гипергликемия, инсулиновая резистентность и усиление процессов воспаления. В условиях СД1 снижается синтез тестостерона тестикулярными клетками Лейдига и нарушается процесс сперматогенеза, что ведет к снижению фертильности. Длительное использование высоких фармакологических доз гонадотропинов для коррекции андрогенного дефицита приводит к снижению гормональной чувствительности рецепторов лютеинизирующего гормона/хорионического гонадотропина человека (ЛГ/ХГЧ) в клетках Лейдига. Альтернативой гонадотропинам являются низкомолекулярные аллостерические агонисты рецептора ЛГ/ХГЧ, созданные на основе структуры тиено[2,3-*d*]-пиримидина, которые взаимодействуют с аллостерическим сайтом, локализованным в трансмембранном домене рецептора. Нами ранее было доказано, что многодневное введение крысам производных тиено[2,3-*d*]-пиримидина не только усиливает тестикулярный стероидогенез в норме, при диабете и старении, но и улучшает чувствительность клеток Лейдига к эндогенному ЛГ. Целью работы было изучить влияние трехдневной обработки самцов крыс Wistar с СД1 с помощью аллостерического агониста рецептора ЛГ/ХГЧ 5-амино-*N*-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)-тиено-[2,3-*d*]-пиримидин-6-карбоксамид (ТП03, 15 мг/кг в сутки) на стероидогенные эффекты сравнительно низкой дозы ХГЧ (10 МЕ/крысу, однократно, п/к). Для индукции СД1 трехмесячным самцам крыс однократно вводили стрептозотоцин (45 мг/кг), а через две недели по уровню постпрандиальной глюкозы (>15 мМ) отбирали животных с развившимся заболеванием. Уровень тестостерона в крови и экспрессия генов, кодирующих стероидогенные ферменты (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*), были значительно снижены у крыс с СД1. Оба препарата, ТП03 и ХГЧ, эффективно стимулировали тестикулярный стероидогенез, что выразилось в повышении уровня тестостерона в крови и нормализации экспрессии стероидогенных генов в семенниках диабетических крыс. Предобработка животных с помощью ТП03 усиливала стимулирующий эффект ХГЧ на уровень тестостерона, хотя слабо влияла на экспрессию стероидогенных генов. Таким образом, ТП03 повышает эффективность стероидогенного эффекта ХГЧ, что позволяет снизить дозу гонадотропина для компенсации андрогенной недостаточности при СД1.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-75-20122).



ПРОИЗВОДНЫЕ ПИРИМИДИНА КСИМЕДОН И ЕГО КОНЬЮГАТ С
L-АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ ТОРМОЗЯТ РАЗВИТИЕ ФИБРОЗА ПРИ
ХРОНИЧЕСКОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ПЕЧЕНИ КРЫС

**Беляев Г.П.¹, Выштакалюк А.Б.^{1,2}, Парфенов А.А.¹, Гумарова Л.Ф.¹,
Галяметдинова И.В.¹, Семенов В.Э.¹, Зобов В.В.^{1,2}**

¹ФГБУН Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
Казань, Россия;

²ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

gregoir4@gmail.com

Фиброз ткани печени характеризуется значительным увеличением волокон коллагена и последующей дисфункцией гепатоцитов. Однако на данный момент не существует единого мнения о способах лечения фиброза. Кроме того, согласно данным ВОЗ в мире продолжает расти количество случаев фиброза. Таким образом, целью нашего исследования стало изучение влияния Ксимедона (I) и его конъюгата с L-аскорбиновой кислотой (II) на развитие хронических фибротических изменений в ткани печени крысы при профилактическом введении препаратов.

До начала моделирования фиброза в течение 7 дней внутрибрюшинно вводили соединение (I) в дозе 0.24 мг/кг и (II) в дозе 0.5 мг/кг, в контрольной группе вводили физраствор в эквивалентном объеме. Затем моделировали фиброз в течение 7 недель путем перорального введения 5% раствора CCl₄ в дозе 0.1 мл/кг 2 раза в неделю и выпаивания 5% этанола через поилки при постоянном доступе, для имитации алкогольной болезни человека. Также в течение этих 7 недель в опытных группах продолжали введение соединений (I) и (II), а в контрольной физраствор. Выраженность фиброза оценивали по площади детекции коллагена на гистологических срезах, окрашенных по Ван-Гизону. Морфометрия выполнялась с помощью светового микроскопа Nikon H550S с программой NIS-Elements BR.

Полуколичественная оценка фиброза печени по шкале Ishak показала, что на фоне воздействия CCl₄+этанол у крыс контрольной группы преобладает стадия 4, характеризующаяся умеренным развитием фиброза, тогда как в группах крыс, получавших соединение (I) и (II), преобладает стадия 1, характеризующаяся легким развитием фиброза, что говорит о замедлении развития фибротических изменений.

В результате количественной оценки фиброза было показано, что при хроническом воздействии CCl₄+этанол в контрольной группе процент площади коллагена достоверно (U-тест, $p < 0.05$) увеличивается в 5.7 раз по сравнению с интактным контролем (6.3 ± 0.9 и $1.1 \pm 0.06\%$ соответственно), что подтверждает развитие фибротических изменений. В группах крыс, получавших дополнительно к воздействию CCl₄+этанол соединения (I) и (II), показано статистически достоверное (U-тест, $p < 0.05$) снижение площади коллагена в ткани печени в 3 раза по сравнению с контрольной группой (2.2 ± 0.1 и $2.1 \pm 0.1\%$ соответственно).

Таким образом, показан антифиброзный эффект исследованных производных пириимидина (I) и (II), поскольку их профилактическое введение при хроническом повреждении печени крыс способствовало уменьшению количества выявляемого коллагена в ткани печени.



ОЦЕНКА ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO* ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭПИРУБИЦИНА

**Букина Ю.О.¹, Ветрова О.С.¹, Рысцов Г.К.², Земскова М.Ю.²,
Гапеев А.Б.², Щербатюк Т.Г.^{1,3}**

¹ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия;

²ФИЦ ПНЦБИ обособленное подразделение Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов РАН, Пушкино, Россия;

³ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт гигиены и профпатологии
Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия; ФИЦ ПНЦБИ обособленное подразделение
Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

Ailin_7@mail.ru

Эпирубицин – это антрациклиновый антибиотик, который входит в рекомендованные схемы лечения рака молочной железы. После внутривенного введения эпирубицин быстро распределяется в тканях организма, локализуясь в ядре, где он образует комплексы с ДНК. Интеркаляция между парами нуклеотидов приводит к нарушению синтеза ДНК, РНК и белков, в связи с чем становится актуальным исследование дозозависимого действия эпирубицина на ДНК клеток *in vitro*.

Мезенхимальные мультипатентные стволовые клетки (MMSC) представляют собой первичную линию клеток. Клетки линии MCF-7 являются эпителиальными и используются в лабораторной практике, как модель люминального подтипа рака молочной железы. Клетки MDA-MB-231 – модель эпителия молочной железы с мутациями основных рецепторов, регулирующих клеточные ответы на ростовые факторы (тройной негативный рак, базальный подтип), и устойчивы к гормон- и химиотерапии. С помощью щелочного варианта метода ДНК-комет оценивали уровень повреждений ДНК в клетках по процентному содержанию ДНК в «хвосте кометы» (%TDNA).

Для всех клеточных линий выявлен достоверный рост уровня повреждений ДНК с увеличением концентрации эпирубицина в диапазоне 1-100 мкг/мл. Сравнение между клеточными линиями при концентрации эпирубицина 1 мкг/мл продемонстрировало отсутствие различий в %TDNA ($p > 0,05$). Для линии MMSC уровень повреждений ДНК составил $2,34 \pm 0,15\%$, для MCF-7 – $2,03 \pm 0,23\%$, а для MDA-MB-231 – $1,88 \pm 0,15\%$. При концентрациях цитостатика 10 и 100 мкг/мл уровень повреждений ДНК в стволовых клетках существенно превосходил значения в опухолевых клетках ($p < 0,001$) и составил $4,37 \pm 0,19\%$ и $6,11 \pm 0,53$ соответственно. При этом у линий MCF-7 и MDA-MB-231 не обнаружено достоверных различий при одной и той же концентрации цитостатика ($p > 0,05$). При концентрации эпирубицина 10 мкг/мл %TDNA у MCF-7 составил $2,68 \pm 0,18\%$, у MDA-MB-231 – $2,38 \pm 0,13\%$, а при 100 мкг/мл у MCF-7 – $4,03 \pm 0,26$, у MDA-MB-231 – $4,03 \pm 0,28\%$.

В результате проведенных исследований было обнаружено, что эпирубицин негативно действует не только на опухолевые клетки, но и на клетки линии MMSC. При этом уровень повреждений ДНК в культивируемых клетках оказывается в два раза выше по сравнению с лейкоцитами крови при действии эпирубицина тех же концентраций. Различия, по всей видимости, связаны с активностью генетического аппарата клеток разных типов. В связи с этим возникает необходимость в обеспечении дополнительной защиты для мезенхимальных стволовых клеток организма в процессе химиотерапии.



РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОМПОЗИТНЫХ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ КАРРАГИНАНА

Винник Д.А.^{1,2}, Фомичёв И.А.^{2,3}, Давыдова Г.А.²

¹ФГАОУ ВО Самарский национальный исследовательский университет
им. академика С.П. Королева, Самара, Россия;

²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия;

³ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биотехнологический факультет, Москва, Россия

darya_vinnik@icloud.com

На сегодняшний день получили широкое распространение полисахаридные гели, используемые для быстрого заживления ран и ожогов. Благодаря их уникальной биосовместимости, гибким методам получения, спектру составляющих и желательным физическим характеристикам, они стали материалом выбора для многих применений в регенеративной медицине.

Каррагинан, полисахарид, полученный из морских водорослей, обладает антиоксидантными, антибактериальными и иммуномодулирующими свойствами. Но в литературе очень мало информации о взаимодействии каррагинана с другими полисахаридами. Целью данной работы является определение оптимальных составов и условий получения биополимерных композиций на основе каррагинана.

Для исследования совместимости каррагинана(К) с другими полисахаридами, такими как альгинат натрия (А), метилцеллюлоза (М), гуаровая (Г) и ксантановая (КК) камеди, при этом суммарная концентрация смешанного раствора по полимеру оставалась равной 2 масс.%. Приготовление всех гелей проводили, выдерживая растворы при 90°C не менее 2-х часов.

Была исследована вязкость полисахаридных композитных гелей при различных соотношениях компонентов. Установлено, что все исследуемые гели в при концентрации 2% являются неньютоновскими жидкостями. Кривые характеристической вязкости, представляющие собой зависимости вязкости от концентрации, позволяют судить о надмолекулярной организации растворов полимеров. Чем больше ход кривых отклоняется от горизонтального положения, тем выше аномалия вязкости, тем значительнее характер течения раствора отличается от ньютоновского. Характер структурообразования в полимерных смесях в значительной степени определяется совместимостью полимерных компонентов. Наибольшая совместимость получена для смесей (К)/(М), для которых в значительном диапазоне составов наблюдается положительное отклонение вязкости от аддитивных величин. Этот факт может свидетельствовать в пользу образования лабильных гетероагрегатов. Для раствора (К)/(А) получено отрицательное отклонение значений вязкости от аддитивных величин, что свидетельствует об ограниченной совместимости этих полимеров в водном растворе. А для растворов (К)/(Г) при концентрациях К в смесях 10-40% наблюдается наибольшее положительное отклонение вязкости от аддитивных величин, что и говорит о взаимодействии этих полисахаридов посредством водородных связей, что подтверждается литературными источниками.

Биосовместимость полученных бинарных соединений на основе каррагинана изучали методами МТТ и прямого контакта на кератиноцитах линии HaCat. Все гели не оказывают угнетающего воздействия на клетки.



АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА PRO12ALA ГЕНА PPARG С GESTАЦИОННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ И ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ

Виноградова А.И.¹, Карпова Н.С.²

¹ФГБОУ ВО ЯрГУ им. П.Г. Демидова, Ярославль, Россия;

²ФГБНУ НИИОПП РАН, Ярославль, Россия

vinogradovaanna80@gmail.com

Беременность, осложненная диабетом – серьезная проблема акушерства, так как организм матери подвергается дополнительной нагрузке. Ежегодно число женщин с гестационным сахарным диабетом (ГСД) растет, что чревато тяжелыми последствиями для матери и ребенка. Преэклампсия (ПЭ) – одно из них, тесно коррелирует с ГСД. Причины, приводящие к ГСД и ПЭ остаются неизученными, так как патологии сложны и многогранны. По многочисленным исследованиям полиморфизм pro12ala гена PPARG связан с увеличением риска развития ГСД и ПЭ, как фактор генетической предрасположенности к патологиям. Для российской популяции ассоциация остается малоизученной. Таким образом, цель исследования: подтвердить ассоциацию pro12ala с ГСД и ПЭ среди женщин российской популяции.

Нами были исследованы образцы ДНК из венозной крови 220 матерей, проживающих в Москве. Респонденты были русскоязычными, неопределенной национальности, добровольно участвовали в исследовании, имели диагноз ГСД и/или ПЭ, без хронических заболеваний. Выделение ДНК производили по Маниатису с лизисом по Канкелю. Генотипы определяли методом ПЦР-РВ на приборе BIO RAD CFX 96 Real Time PCR Machine. Анализ на ассоциацию провели в программе Definneti (Германия).

Анализ полиморфизма pro12ala гена PPARG в 3 хромосоме в позиции 12351582-12351680 (сборка Grch38.) позволил оценить частоту встречаемости аллелей, генотипов полиморфного локуса исследуемого гена. При анализе распределения генотипических и аллельных частот выявлено, что частота встречаемости аллеля G в группе беременных с ПЭ на фоне ГСД составила 29,2%, в группе с ГСД – 19,5%. Частота встречаемости гетерозиготного генотипа CG (24,79%) выше в группе с ПЭ на фоне ГСД, в сравнении с группой с ГСД (20,12%). При анализе ассоциаций установлена взаимосвязь полиморфизма pro12ala гена PPARG у беременных с ПЭ на фоне ГСД. Так, гомозиготный генотип GG и гетерозиготный генотип CG в общей модели наследования являются генетическими факторами предрасположенности к ПЭ у женщин с ГСД, увеличивая риск его развития в 2,5 и 2,3 раза в общей (ОШ=2,538; ДИ=1,23-5,363; P-value – не значителен) и рецессивной (ОШ=2,3333; ДИ=1,131-4,815; P-value – не значителен) моделях наследования соответственно. Таким образом, мы подтвердили ассоциацию полиморфизма pro12ala с ПЭ на фоне ГСД по аллелю G. Стоит отметить, что ПЭ и ГСД имеют не только схожие факторы риска, но и сам ГСД является фактором риска развития ПЭ, поэтому мы можем установить, что с увеличением риска развития ГСД также растет риск развития ПЭ.



БИОФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ МИКРОЧАСТИЦ ИЗ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ВОССТАНОВЛЕНИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Владимирова А.В.¹, Муруева А.В.², Прудникова С.В.¹, Шишацкая Е.И.¹

¹ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет;

²ФГБНУ Институт биофизики СО РАН

aleksa-vladimirova@yandex.ru

Разработка материалов из биodeградируемых полимеров представляет интерес для биомедицины, для тканевой инженерии и контролируемой доставки лекарств. Полигидроксиалканаты (ПГА) использовались в качестве биорезорбируемого полимера для применения в тканевой инженерии. Их основным преимуществом является биосовместимость и медленная скорость разложения. Однако поверхность ПГА является гидрофобной, что приводит к плохой адгезии клеток и медленной скорости их пролиферации. Карбодиимидная реакция с активацией карбоксильных групп является одним из эффективных методов биофункционализации поверхности полимеров белковыми компонентами за счет образования химических связей между аминоклуппами белков и карбоксильными функциональными группами.

Цель работы – модификация поверхности микрочастиц из сополимера 3-гидроксибутирата с 3-гидроксивалератом (П(ЗГБ-со-ЗГВ)) белковыми компонентами и изучение характеристик полученных систем для потенциального применения в тканевой инженерии и дерматологии.

В работе использован сополимер (П(ЗГБ-со-ЗГВ)), 1500 кДа, содержание ЗГВ 18%. Микрочастицы были получены эмульсионным методом. Биофункционализацию растворами протеината серебра, коллагена 1-го типа и бычьего сывороточного альбумина (БСА) проводили в течение 24 часов при комнатной температуре после активации карбоксильных групп карбодиимидной реакцией.

Результаты показали, что микрочастицы без поверхностной модификации имели размер от 63,56 до 70,80 мкм; электрокинетический потенциал в диапазоне от -19,20 до -27,50 мВ. При карбоксилировании микрочастиц ζ -потенциал становится более отрицательным (от -27,3 до -35,5 мВ), также уменьшается размер ($53,96 \pm 1,4$ мкм). Ковалентное присоединение протеината серебра с эффективностью сшивания 89% изменяет электрокинетический потенциал ($+16,8 \pm 2,1$ мВ). После поверхностной модификации частицы показали стабильность формы в суспензии в течение месяца при хранении в условиях, имитирующих внутреннюю среду организма. Зоны ингибирования роста микроорганизмов составили 2,5 мм для *Staphylococcus aureus* и 2,2 мм для *Escherichia coli*.

Таким образом, показано, что ковалентное сшивание с помощью карбодиимидной реакции позволяет эффективно биофункционализировать полимерные материалы белковыми компонентами для потенциального применения в восстановлении мягких тканей. В целом, результаты показали удовлетворительные антибактериальные свойства и стабильность сконструированных биополимерных форм в виде микрочастиц в модельной среде *in vitro*.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ДИГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ ПРИ РЕДАКТИРОВАНИИ ГЕНОМА КЛЕТОК ЛИНИИ СНО

Гаямова Е.А.^{1,2}, Даянова Л.К.^{1,3}, Ковнир С.В.¹, Воробьев И.И.^{1,3}, Орлова Н.А.¹

¹ФИЦ Биоинженерии РАН – Институт биоинженерии им. К.Г. Скрыбина, Москва;

²ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

³ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

elizavetagaiam@gmail.com

Клетки яичника китайского хомячка СНО широко используются для создания продуцентов терапевтически значимых белков различных классов. Во многих случаях для получения продуцентов на основе клеток СНО используют селекционный маркер дигидрофолатредуктазу (DHFR), эффективность данного маркера особенно высока при применении производных суб-линий СНО с инактивацией одного или двух аллелей собственного гена *dhfr*. Генетические конструкции с маркером устойчивости DHFR могут быть амплифицированы в геноме клеток, не содержащих собственных функциональных аллелей гена *dhfr*, в результате чего удельная продуктивность таких продуцентов может быть увеличена в десятки раз. Существующие суб-линии СНО с инактивацией гена *dhfr* были получены методами ненаправленного мутагенеза и содержат множественные нарушения метаболических систем и хромосомные aberrации, что ограничивает их способность поддерживать высокий уровень секреции корректно гликозилированных белков в плотных культурах. Суб-линии СНО с инактивацией гена *dhfr* могут быть получены методами направленного редактирования CRISPR/Cas9. Ранее нами были получены линии клеток на основе базовой линии СНО K1, содержащие по данным анализа генома, полную инактивацию одного или двух аллелей гена *dhfr*. В данной работе исследовали остаточную ферментативную активность DHFR в отредактированных клетках при помощи спектрофотометрии. Измеряли скорость реакции восстановления дигидрофолата натрия, катализируемой DHFR, по падению оптической плотности при длине волны 340 нм в результате уменьшения концентрации кофактора NADPH, затрачивающегося в реакции.

Получены следующие результаты: в интактных клетках СНО активность DHFR составляет $2,0 \pm 0,4$ мЕд/мг, для клеток с генотипом *dhfr*^{+/+} $0,4 \pm 0,2$ мЕд/мг (падение в 5 раз, функциональный аллель гена *dhfr* содержит инсерцию трех нуклеотидов в точке редактирования), а в клетках с генотипом *dhfr*^{-/-} активность DHFR не выявляется.

Сделан вывод, что в результате направленного нокаута двух аллелей гена *dhfr* собственная ферментативная активность DHFR в клетках СНО исчезает полностью.



ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СПИННОГО МОЗГА НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

Голубенко М.А., Архипова С.С., Салафутдинов И.И.

ФГАОУ ВО Казанский Федеральный Университет, Казань

golubenkomasha@yandex.ru

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением двигательных нейронов в моторной коре головного мозга и в передних рогах спинного мозга. Клиническое проявление заболевания заключается в параличе конечностей, мышечной атрофии, дыхательной недостаточности, что ведёт к летальному исходу. Изучение тканей спинного мозга на различных стадиях заболевания необходимо для понимания наиболее перспективных клеток-мишеней для эффективного терапевтического воздействия. Данный подход способствует улучшению как методов диагностики БАС, так и новых стратегий терапии этого заболевания.

Были исследованы клеточные линии передних рогов на поперечных срезах спинного мозга hSOD1 мышей с БАС (B6SJL-TG(SOD1-G93A)dl1Gur/J) на доклинической, клинической и терминальной стадии заболевания, а также контрольных мышей того же возраста. Методом иммунофлюоресцентной конфокальной микроскопии был проведён морфометрический и количественный анализ популяций глиальных клеток на каждой стадии: GFAP+реактивных астроцитов, IBA1+ реактивной микроглии, NG2-протеогликан+ NG2-глии и Olig2+олигодендроцитов.

Количественный анализ показал, что на стадии клинических проявлений происходит увеличение количества реактивных астроцитов в сером веществе передних рогов по сравнению с доклинической стадией и контролем. Этот процесс продолжается вплоть до терминальной стадии развития заболевания. Однако активизация микроглии происходит только на терминальной стадии развития БАС. Количество олигодендроцитов снижается постепенно на стадии клинических проявлений, на терминальной стадии визуализируются единичные олигодендроциты. Экспрессия NG2 протеогликана в спинном мозге контрольных мышей выявляется в основном в клетка-предшественниках олигодендроцитов (ОПС), а на стадии клинических проявлений – еще в реактивных астроцитах. На терминальной стадии количество NG2+ ОПС клеток снижается, однако экспрессия NG2 протеогликана другими клетками, в частности, реактивными астроцитами достоверно увеличивается.

Выявлено, что реактивный астроглиоз происходит уже на доклинической стадии БАС. По мере развития заболевания на следующей стадии выделяемые реактивными астроцитами цитокины активируют NG2 клетки, которые реагируют на изменения в ЦНС при БАС, отвечая усиленной пролиферацией. Однако денервированные олигодендроциты погибают, и на терминальной стадии происходит пролиферация активированной микроглии, которая фагоцитирует дегенерировавшие клетки. В итоге формируется глиальный рубец: астроциты-NG2клетки-микроглия.



ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЛЕЙКОЗНЫХ КЛЕТОК В ЭРИТРОИДОПОДОБНОМ
НАПРАВЛЕНИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ИЗМЕНЕНИЕМ ЭКСПРЕССИИ
РЕЦЕПТОРОВ К TRAIL

Дергилева А.Д.¹, Ломовская Я.В.², Кобякова М.И.², Ломовский А.И.², Фадеев Р.С.²

¹ФГБОУВО Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²ФГБУН Институт теоретический и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

Anna.Dergileva@student.msu.ru

Ранее нами было показано, что снижение экспрессии проапоптотических рецепторов к TRAIL, а также повышение устойчивости к TRAIL-индуцированному апоптозу, может происходить в процессе направленной дифференцировки миелоидных лейкозных клеток линий THP-1, HL-60 и K562 в моноцитарно-макрофагоподобном, гранулоцитоподобном и мегакариоцитоподобном направлении, соответственно. Данная работа направлена на изучение экспрессии рецепторов к TRAIL, таких как DR4 и DR5, при дифференцировке миелоидных лейкозных клеток линии K562 в эритроидоподобном направлении.

В работе использовали клетки хронического миелоидного лейкоза K562, обработанные индукторами эритроидной дифференцировки – геминном (Gem) и бутиратом натрия (SB). Инкубация клеток осуществлялась с 50 мкМ Gem в течение 96 часов (K562 Gem), также клетки обрабатывали 1 мМ SB в течение 168 часов (K562 SB). Анализ экспрессии DR4 и DR5 осуществляли методом проточной цитометрии с помощью двойного окрашивания при использовании соответствующих моноклональных антител.

Анализ экспрессии проапоптотических TRAIL-рецепторов DR4 и DR5 показал, что наибольшее изменение экспрессии в группах дифференцированных клеток K562 Gem и K562 SB наблюдается в популяциях клеток, несущих оба рецептора DR4 и DR5, а также в популяциях отрицательных по DR4, но имеющих DR5, в сравнении с контрольными необработанными клетками K562. У клеток K562 Gem и K562 SB снижалось количество клеток, имеющих одновременно как DR4, так и DR5, и составляло 24±2% и 11±3%, соответственно, в сравнении с клетками K562, у которых популяция клеток, несущих оба рецептора составила 59±2%. Также у клеток K562 Gem и K562 SB значительно увеличивалось число клеток, несущих только DR5 – 70±2% и 83±3%, соответственно, относительно контрольных клеток, у которых популяция, несущая только DR5 составляла 16±1%.

Таким образом, в процессе направленной эритроидоподобной дифференцировки у миелоидных лейкозных клеток наблюдается снижение числа клеток, имеющих оба рецептора DR4 и DR5, но повышается количество, несущих только DR5, что может влиять на чувствительность лейкозных клеток при эритроидной дифференцировке к TRAIL-индуцированному апоптозу.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90061.



VOXTALISIB ПОДАВЛЯЕТ ХОЛИНЕРГИЧЕСКУЮ Ca^{2+} -СИГНАЛИЗАЦИЮ ПО МЕХАНИЗМУ, НЕЗАВИСИМОМУ ОТ ИНГИБИРОВАНИЯ PI3K И mTOR

Дымова Е.А., Воронова Е.А.

ФИЦ ПНЦБИ Институт биофизики клетки РАН, Пушчино, Россия

dyмова.ek.a@gmail.com

Сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR патологически активирован в клетках опухолей различного происхождения, а ингибиторы элементов этого пути используются в качестве лекарственных средств для противоопухолевой терапии. Ингибитор PI3K и mTOR Voxelotin находится на стадии клинических испытаний, в ходе которых установлено, что он вызывает многочисленные и разнообразные побочные эффекты. Побочные эффекты Voxelotin могут быть связаны с тем, что помимо установленного ингибирования PI3K и mTOR, это вещество может воздействовать и на другие клеточные мишени.

В данной работе с помощью мониторинга внутриклеточного Ca^{2+} в одиночных клетках линии HEK293 исследовали влияние Voxelotin на Ca^{2+} -сигналы, инициированные ацетилхолином. Стимуляция клеток ацетилхолином вызывала в них Ca^{2+} -ответы, которые блокировались в присутствии Voxelotin. Формально это можно интерпретировать как свидетельство участия PI3K/Akt/mTOR пути в генерации Ca^{2+} -ответов на ацетилхолин. Однако ингибиторы PI3K и mTOR другой химической природы Wortmannin и Rapamycin, примененные как по отдельности, так и совместно, не влияли на способность клеток отвечать на ацетилхолин. То есть Voxelotin блокировал Ca^{2+} -ответы на ацетилхолин не за счет ингибирования PI3K и/или mTOR. Обращал на себя внимание тот факт, что Voxelotin блокировал ответы при его одновременной аппликации с агонистом, тогда как обычно ингибирование внутриклеточных мишеней требует времени для проникновения ингибитора через плазматическую мембрану и его накопления в цитозоле. Тот факт, что Voxelotin блокировал клеточные ответы без предварительной инкубации, указывал на возможность внеклеточного действия этого соединения, то есть в качестве вероятной мишени могли выступать сами мускариновые рецепторы. Наши эксперименты с ингибиторами мускариновых рецепторов показали, что ацетилхолин инициирует Ca^{2+} -сигнализацию в клетках HEK293 при участии преимущественно M3-рецепторов. Для подтверждения возможности связывания Voxelotin с M3-мускариновым рецептором мы планируем использовать методы вычислительной биофизики.

Таким образом, нами показано, что Voxelotin способен блокировать внутриклеточную Ca^{2+} -сигнализацию, индуцированную ацетилхолином. Также получены косвенные свидетельства того, что в основе этого эффекта лежит связывание Voxelotin с M3-мускариновыми рецепторами. Возможно, именно с этим свойством Voxelotin связаны побочные эффекты, вызываемые приемом этого соединения в качестве лекарственного средства.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-74-00056.



ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ТРАНСПОРТЁРОВ ОРГАНИЧЕСКИХ АНИОНОВ 1В1 И 1В3 *IN VITRO*

Ерохина П.Д.

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Рязань, Россия

erokhina.pelageya96@yandex.ru

Транспортёры органических анионов 1В1 и 1В3 (ОАТР1В1 и ОАТР1В3) являются клинически значимыми транспортёрами. Доказано, что от активности ОАТР1В1 и ОАТР1В3 зависит проникновение их субстратов (билирубин, иАПФ, сартаны, статины) в печень, где развивается действие многих препаратов и протекает биотрансформация. Угнетение работы этих белков может привести к развитию побочных эффектов препаратов, являющихся их субстратами. Изучение функционирования ОАТР1В1 и ОАТР1В3 сможет улучшить профиль безопасности лечения и поможет спрогнозировать возможные межлекарственные взаимодействия на уровне этих переносчиков.

Таким образом, целью данной работы стала разработка методики оценки функционирования белков-переносчиков ОАТР1В1 и ОАТР1В3 *in vitro*.

Исследование выполнено на линии клеток НерG2. Клетки высевали в 24- и 6-луночные планшеты и культивировали до формирования монослоя. Активность транспортёров оценивалась по транспорту их маркерного субстрата аторвастатина. Для этого в лунки планшета добавляли аторвастатин в концентрации 1 мкМ и инкубировали клетки 5, 15 и 30 минут. По истечении срока инкубации клетки лизировали методом трёхкратной заморозки-разморозки при -80°C . В лизатах определяли концентрацию аторвастатина методом ВЭЖХ-МС/МС.

Для подтверждения адекватности методики был проведён эксперимент с ингибитором ОАТР1В1 и ОАТР1В3 рифампицином. В лунки планшета добавляли раствор рифампицина (100 мкМ) и запускали 15-минутную преинкубацию. После истечения времени преинкубации рифампицин удаляли из лунок и добавляли к клеткам смесь растворов аторвастатина (1 мкМ) и рифампицина (100 мкМ), инкубировали 5, 15 и 30 минут.

Для подтверждения наличия ОАТР1В1 и ОАТР1В3 в образцах проводили вестерн-блоттинг. Для этого белки лизата клеток подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле, после чего визуализировали с использованием первичных (1:2000) и вторичных (1:4000) антител.

Для анализа результатов использовали программу «StatSoft Statistica 13.0», дисперсионный анализ (ANOVA) и критерий множественного сравнения Фишера.

Концентрация аторвастатина в клетках линии НерG2 постепенно повышалась, максимума к 30 минуте эксперимента. При добавлении рифампицина проникновение аторвастатина в клетки снижалось к 30 минуте.

Методом вестерн-блот было подтверждено наличие ОАТР1В1 и ОАТР1В3 в лизатах клеток НерG2.

Была разработана методика для изучения функционирования транспортёров органических анионов 1В1 и 1В3 *in vitro*.



ГЕНОПРОТЕКТОРНЫЕ И РАДИОЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ МЕТФОРМИНА, ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ И МЕКСИДОЛА

**Карманова Е.Е.^{1,2}, Усачева А.М.¹, Черников А.В.¹, Замятина Е.А.¹,
Аникина В.А.¹, Попова Н.Р.¹, Брусков В.И.¹**

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия;

²ФИЦ ПНЦБИ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

silisti@bk.ru

Радиозащитные средства по времени их введения в организм относительно облучения принято подразделять на адаптогены и радиопротекторы, применяемы до облучения, а также радиомитигаторы, как терапевтические средства применяемы после облучения. Актуальным направлением исследований является поиск новых радиомитигаторов, среди лекарственных препаратов, которые уже широко применяются в медицинской практике для лечения различных заболеваний.

Для исследования нами были выбраны три препарата. Первый – антидиабетический препарат метформин (1,1 – диметилбигуанидин гидрохлорид), широко используемый во всем мире. Вторым препаратом является отечественный Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат), который в течение длительного времени успешно применяется при комплексной терапии различных заболеваний. Третий препарат – α -липоевая кислота (ЛК, тиоктовая кислота, (R-5-(1,2-дителиолан-3-ил)пентановая кислота) – антиоксидант, митохондриальный метаболит, коэнзим и нейропротектор.

Радиозащитные и генопротекторные свойства этих препаратов исследовали методом микроядерного теста (МЯ-тест) в зависимости от времени введения препаратов относительно рентгеновского облучения самцов мышей Kv:SHK. МЯ-тесты показали наличие зависимости радиозащитного эффекта исследуемых препаратов от времени введения препарата. При введении мышам 40 мг/кг ЛК за 15 мин до облучения в дозе 1,5 Гр, а также через 15 мин, 6 и 24 ч после облучения количество полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с МЯ снижалось на 40, 60, 40 и 0% соответственно. При пероральном введении метформин 300 мг/кг снижает процент образования МЯ в ПХЭ после облучения в дозе 2 Гр в 3,5 и 1,6 раза при введении через 15 мин и 6 ч после облучения соответственно. При этом введение метформина за 15 мин до облучения и через 24 часа после облучения не оказывает статистически значимого эффекта. Мексидол в концентрации 50 мг/кг снижает процент образования МЯ в ПХЭ после облучения в дозе 1,5 Гр на 90, 90, 70 и 0% соответственно при введении до облучения, через 15 мин, 6 ч и 24 ч после облучения. Таким образом, мексидол и ЛК проявляет как радиопротекторные, так и радиомитигаторные свойства, тогда как метформин только радиомитигаторные свойства.

Работа выполнялась по госзаданию ИТЭБ РАН тема № 05 направление 59.



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ RS4769613, АССОЦИИРОВАННОГО С ПРЕЭКЛАМПСИЕЙ, НА САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ TFBS

Карпова Н.С.

ФГБНУ НИИОПП, Москва, Россия

nataliakarpova.sp@gmail.com

Поскольку неинвазивный генетический тест плода можно проводить начиная с 10 недели беременности, возможность исследовать полиморфизмы в промоторной области гена FLT1, ассоциированные с риском развития преэклампсии, что позволит еще до возникновения симптомов и без использования клинико-лабораторных анализов выявить женщин высокой группы риска развития преэклампсии. Так McGinnis and Steinhorsdottir et al. обнаружили, что полиморфизм rs4769613-C ассоциирован с преэклампсией, причем находится рядом с ранее обнаруженными GWAS rs4769612-C (p-value 4×10^{-14}) и rs7318880-T (p-value 8×10^{-8}). Поэтому был проведен поиск в области данных полиморфизмов на наличие регуляторных областей в UCSC браузере, с использованием GRCh38/hg38 сборке генома человека. Полиморфизм rs4769613 расположен chr13:28564111-28564482 и находится в регуляторной области, согласно проекту cCREs ENCODE и oRegAnno. В соответствии с cCRE ENCODE SCREEN в данной области находится 1 регуляторный элемент: EN38E1663332, дистальная энхансерная сигнатура которого возрастает в плаценте на 16 неделе беременности, что в свою очередь объясняет повышение экспрессии FLT1. Более того, в данной области находятся сайты связывания многих транскрипционных факторов (TF). Исходя из этого мы предположили, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в данной области могут изменять экспрессию генов, посредством изменения сайтов связывания транскрипционных факторов (TFBS). При проверке гипотезы о влиянии аллеля С rs4769613 на TFBS с использованием HumanTFDB мы обнаружили изменения со стороны 18 TFBS: AR, BRD4, CBX3, EPAS1, ERG, ESR1, FOXM1, FOXP3, GATA3, GLYR1, HAND1, NFYB, RUNX2, TCF7L2, TOP1, TP53, TP63, TRIM28. Для AR EPAS1, FOXP3, GLYR1, HAND1, TOP1, TP53 число TFBS снижается при замене С на Т. И напротив увеличиваются или появляются TFBS для CBX3, BRD4, ERG, ESR1, GATA3, NFYB, RUNX2, TCF7L2, TP63, TRIM28. В случае аллеля Т число связывания сайтов для AR уменьшается с 17 до 15. Это косвенно подтверждает взаимосвязь мутаций в AR и преэклампсии. Также стоит отметить появление 4 новых сайтов связывания для FOXM1, экспрессия которого повышена при ожирении являющегося фактором риска развития преэклампсии.

Анализ rs4769613 показал изменения со стороны TFBS, причем для 18 TF, связанных с ожирением, гипоксией и преэклампсией, что свидетельствует о необходимости дальнейшего подтверждения данной находки с помощью экспериментов.



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ СКАЛЬПИРОВАННЫХ РАН

Козмай Я.А.¹, Солоп Е.А.^{1,2}, Сторожук С.В.¹, Мелконян К.И.¹

¹ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет МЗ РФ,
Краснодар, Россия;

²ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

yana.kozmay@gmail.com

В настоящее время активно разрабатываются раневые покрытия на основе различных природных полимеров, которые способны стимулировать процессы регенерации. Особое внимание уделяется раневым покрытиям на основе коллагена, который способствует ангиогенезу и пролиферации клеток соединительной ткани. В данной работе с помощью сравнительного гистологического анализа исследовалась эффективность разработанного гидрогеля на основе дермы при лечении скальпированных ран в эксперименте.

Исследование было проведено на 15 самцах крыс породы Сфинкс массой 160-200 г возрастом 3-4 месяца. Крысы были разделены на три группы: группа 1 – без лечения, или контрольная группа (n=5), группа 2 – лечение коммерческим препаратом «Альгипор-М» («ООО ГК Пальма», Россия) на основе альгината, или группа сравнения (n=5), и группа 3 – лечение разработанным гидрогелем на основе дермы, или опытная группа (n=5). Раны крыс групп 2 и 3 обрабатывали препаратами в объёме 0,3 г каждый день до 7-го дня эксперимента включительно. Образцы кожи эксплантировались на 3-и, 7-е и 14-е сутки с прилежащими тканями для рутинного гистологического исследования (H&E).

На 3-и сутки после нанесения скальпированной раны в образцах кожи крыс контрольной группы наблюдались выраженные воспалительные и некротические изменения. При этом на 7-е сутки на фоне стихающего воспаления отмечалась регенерация эпидермиса в виде мелких кластеров. В группе сравнения на 3-и сутки некротические изменения были менее значительны и наблюдалось слабое полнокровие сосудов. На 7-е сутки в этой же группе в целом была сходная с таковой для контрольной группы: воспаление в дерме практически отсутствовало, дистрофические изменения были выражены минимально. В опытной группе на 3-и сутки морфологическая картина ран характеризовалась умеренно выраженным воспалением и скудной воспалительной инфильтрацией при выраженном отеке поверхностных слоев ран. На 7-е сутки в данной группе отмечалось более выраженное полнокровие сосудов, некробиотические изменения стромы и её отёк. При исследовании образцов, полученных на 14-е сутки после нанесения раны, различия в подгруппах животных были минимальны.

Таким образом, было выявлено, что на ранних этапах заживления скальпированной раны лечение опытным гидрогелем снижало воспалительные процессы наравне с коммерческим препаратом.



МОДЕЛИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ МЫШАХ

Кубекина М.В., Брутер А.В., Коршунова Д.С., Силаева Ю.Ю.

ФГБУН ИБГ РАН, Москва, Россия

kubekina@genebiology.ru

С митохондриальными дисфункциями связывают внушительную долю распространенных наследственных заболеваний человека, таких как нейродегенеративные расстройства, кардиомиопатии, рак, диабет. Разработка терапии митохондриальных дисфункций затруднена ввиду отсутствия адекватных моделей этих патологий. Очевидно, что совершенствование подходов к лечению митохондриальных патологий требует адекватных тест-систем.

PolG- α представляет собой кодируемый в ядре фермент, который обеспечивает репликацию и репарацию митохондриальной ДНК. Мутация D257A PolG- α приводит к модификации N-концевого «корректирующего» домена и лишает фермент 3'-5' экзонуклеазной активности, что обеспечивает накопление мутаций в митохондриальном геноме. В зиготы мыши микроинъектировали генетическую конструкцию, несущую мутантный вариант ORF гена *Polg* мыши и кодирующую последовательность GFP под STOP-кассетой, фланкированной сайтами LoxP. Для активации трансгена использовали активаторную линию CMV-Cre с системной активацией, также существуют линии Cre с активацией в других тканях (нейроны, иммунные клетки, легкие, эндотелий). Для подтверждения вставки и Cre-зависимой активации трансгена было проведено генотипирование и определение количества копий трансгенной кассеты в геноме мыши с помощью количественной ПЦР и была продемонстрирована флуоресценция GFP.

Двух первичных трансгенных животных использовали в качестве родоначальников двух линий с числом копий трансгена ~ 7 и ~ 5 . После системной активации количество копий трансгена снижается до $\sim 1,0$. Была разработана модель с индуцируемой экспрессии мутантного варианта гена *Polg*. Это первая генетически модифицированная модель тканеспецифичной митохондриальной дисфункции.

Нам впервые удалось разработать модель индуцируемой тканеспецифичной митохондриальной дисфункции. Она позволит оценить влияние повышенной мутационной нагрузки митохондриального генома определенной ткани на жизнедеятельность целого организма. Наша модель открывает широкие возможности для изучения митохондриальной дисфункции в нейронах, иммунных, мышечных, эндотелиальных клетках, что представляет значительный научный интерес. Полученные животные представляют собой новую тест-систему для изучения биологии митохондрий и эффективности митопротективных препаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта 19-34-90073.



ВЛИЯНИЕ PRDX6 НА ВЫЗВАННУЮ РАДИАЦИЕЙ СЕНЕСЦЕНЦИЮ ФИБРОБЛАСТОВ

**Кузекова А.А.^{1,2}, Новоселова Е.Г.², Парфенюк С.Б.², Хренов М.О.²,
Лунин С.М.², Глушкова О.В.²**

¹ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино, Россия;

²ФИЦ ПНЦБИ Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, Россия

glushckova@mail.ru

Одним из факторов, вызывающих стресс-индуцированное преждевременное клеточное старение, является ионизирующее излучение (ИО). Повреждения ДНК и накопление активных форм кислорода под действием ИО являются причиной сенесценции – необратимой остановки клеточного цикла в G1, при которой клетки становятся устойчивыми к апоптозу и секретируют целый ряд провоспалительных факторов, влияющих на функционирование соседних клеток. Накопление в организме или в культуре сенесцентных клеток приводит к паракринному старению на уровне тканей, органов и организма в целом. Поэтому поиск новых препаратов, обладающих сенолитическим, сеностатическим и сеноморфным потенциалом является перспективным направлением современной науки. Ранее нами было показано, что уникальный белок-антиоксидант пероксиредоксин 6 (Prdx6) способен снижать выраженность агрессивного фенотипа сенесцентных клеток (SASP) в модели стационарного старения. Кроме того, в наших предыдущих исследованиях мы доказали, что Prdx6 обладает выраженным радиопротекторным действием как *in vitro*, так и *in vivo*. Целью настоящей работы явилось изучение влияния экзогенного Prdx6 на выживаемость, пролиферацию, антиоксидантный статус, накопление основных маркеров сенесценции и выраженность SASP у 3T3-фибробластов, облученных 16 Гр рентгеновского излучения.

Было показано, что облучение 3T3-клеток в дозе 16 Гр приводило к достоверному накоплению сенесцентных клеток в культуре, о чем свидетельствовали повышенные уровни АФК, маркеров сенесценции (активность SA-β-галактозидазы, pH-H2AX, p21), провоспалительных цитокинов и снижение уровня пролиферации по сравнению с контролем (необлученные клетки). Добавление через 4 часа после облучения 0,15 мг/мл рекомбинантного Prdx6 в культуральную среду достоверно снижало содержание сенесцентных клеток в культуре.

Таким образом, экзогенный рекомбинантный Prdx6 снижает уровень старения облученных фибробластов, что свидетельствует об универсальной гетеропротективной активности этого белка как при естественной, так и при индуцированной сенесценции. Применение Prdx6 представляется перспективным подходом для коррекции патологий, сопровождающихся окислительным стрессом, в том числе, и при накоплении сенесцентных клеток при старении и развитии возраст-ассоциированных заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00216.



РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА КОПИЙ ГЕНОМОВ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ЭНТЕРОВИРУСОВ В ТКАНЯХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Курочкина Ю.А.^{1,2}, Козлов А.Е.^{1,2}, Басовский Ю.И.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия;

²АО «Биокад», Россия

juli3k@yandex.ru

Энтеровирусы (*Enterovirus*) – род безоболочечных (+)РНК-вирусов. Вследствие высокой цитолитической активности и широкой представленности их рецепторов на клетках различных видов рака они являются перспективной группой агентов для онколитической виротерапии. Доклиническое изучение фармакокинетики лекарственных средств на основе онколитических вирусов осуществляется в рамках исследования их биораспределения – *in vivo* распределения, персистирования и выведения препарата в месте введения, целевых и нецелевых тканях и биологических жидкостях. Для получения профиля биораспределения Международный совет по гармонизации технических требований к лекарственным препаратам для медицинского применения (ICH) рекомендует проводить детекцию и измерение вирусных нуклеиновых кислот чувствительными методами, например, с использованием полимеразной цепной реакции «в реальном времени» (кПЦР).

Целью данной работы является разработка и валидация методики для определения количества копий геномов энтеровирусов (коксакивируса и полиовируса) в тканях лабораторных животных, основанной на кПЦР с обратной транскрипцией.

В рамках разработки методики выбрана и клонирована в составе плазмидного вектора последовательность для детекции (гены протеазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы энтеровирусов). Подобраны и протестированы по три набора праймеров и Taqman-зондов для кПЦР для каждого из вирусов. Проведено сравнение стандартных образцов (вирусного стока и *in vitro* T7-транскриптов целевой последовательности) и продемонстрирована возможность использования T7-транскриптов вместо вирусного стока. Также были оценены основные валидационные параметры методики (специфичность, чувствительность, линейность, аналитический диапазон, правильность и прецизионность).

Испытание разработанной методики проводилось на образцах тканей NOG-мышей с ксенографтом клеточной линии рака молочной железы человека MDA-MB-231, инфицированных полиовирусом (исследовалась конечная точка – 230 дней после введения препарата). Было показано присутствие вируса во всех анализируемых образцах (кровь, головной мозг, сердце, лёгкое, почка, печень, яичник, скелетная мышца, селезёнка, опухоль), а также его повышенное содержание в метастазированных и опухолевых тканях.

Таким образом, разработана методика определения количества копий геномов энтеровирусов в тканях лабораторных животных и оценены её валидационные параметры. Методика была успешно апробирована в доклинических исследованиях биораспределения полиовируса в ксенографтных мышцах.



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА ПОДВИЖНОСТЬ *CAENORHABDITIS ELEGANS* И РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Мехова А.А.¹, Романов А.А.², Самусева П.Д.³, Орлов Ю.А.²

¹ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО,
Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический
университет, Санкт-Петербург, Россия

alex.mekhova@gmail.com

Наночастицы серебра (AgNPs) благодаря своим уникальным физико-химическим и антибактериальным свойствам находят все большее применение в медицине, фармацевтике, при изготовлении лабораторного оборудования и т.д. При этом данных об их безопасности для эукариотов недостаточно.

В настоящей работе в качестве экспериментальной эукариотической модели для исследования токсичности AgNPs использовали свободно живущую почвенную нематоду *C. elegans*. Это круглый червь длиной около 1 мм, обладающий всеми необходимыми характеристиками для лабораторной экспериментальной модели и широко используемый в исследованиях по токсикологии, нейрофизиологии, генетике и т.д.

В работе изучали влияние AgNPs на подвижность нематоды – важный физиологический показатель здоровья животного, при этом использовали нематод двух штаммов: дикого (N2) и мутантного (H828Q). Последний имеет аминокислотную замену в медь-транспортной АТФ-азе CUA-1, аналогичную самой распространенной мутации в АТФ-азе Вильсона H1069Q. Показано, что этот штамм проявляет высокую чувствительность к повышенным концентрациям Cu и Ag в среде. Исследуемые AgNPs получили методом восстановления серебра из раствора AgNO₃ гидразином в мицеллах, образованных олеатом калия. Кристаллическая природа полученных AgNPs подтверждается UV/vis-спектром. По данным трансмиссионной электронной микроскопии частицы имеют сферическую форму и диаметр 30-40 нм, подтвержденный методом лазерной дифрактометрии.

Нематод обоих штаммов инкубировали на чашках Петри с различными концентрациями AgNPs в среде (0 – 2 мкг/мл) в течение 2,5 дней с момента вылупления. Затем червей по одному помещали в каплю воды, где они могли двигаться беспрепятственно, и с помощью камеры, встроенной в стереоскоп, регистрировали синусоидальные движения червя. Для автоматизации обработки видео был разработан алгоритм подсчета количества двойных изгибов *C. elegans*, основанный на совмещении подходов компьютерного зрения для сужения области поиска и теории графов для восстановления структуры искомого объекта.

Полученные результаты показали, что подвижность нематод H828Q значительно снижалась при увеличении концентрации AgNPs в среде в то время, как подвижность штамма N2 при той же концентрации AgNPs оставалась практически неизменной. Автоматический способ обработки записей движений *C. elegans* позволил значительно повысить эффективность проводимого эксперимента, по сравнению с обработкой записей вручную при сравнимой точности.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-24-00762.



ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕКСАНОВОГО ЭКСТРАКТА ИСТИННЫХ ТРЮФЕЛЕЙ

**Моргунова М.М.^{1,2,3}, Шашкина С.С.^{1,2}, Дмитриева М.Е.¹, Переляева Е.В.¹,
Тигунцева Н.П.², Евстафьев С.Н.², Аксенов-Грибанов Д.В.^{1,3}**

¹ФБГОУ ВО Иркутский Государственный Университет, Иркутск, Россия;

²ФБГОУ ВО Иркутский национальный исследовательский технический университет,
Иркутск, Россия;

³ООО ГРИНТЕХБАЙКАЛ, Иркутск, Россия

marymikhmorg@gmail.com

Принимая во внимание проблему поиска агентов для лечения нейродегенеративных заболеваний, особый интерес представляют нетривиальные источники биологически активных веществ. В данном исследовании таким источником выступают истинные трюфели рода *Tuber spp*, отобранные в пригороде г. Сочи. Экстракцию из 1 г измельченных высушенных плодовых тел проводили в течение 24 ч смесью хлороформа и метанола (2:1). Полученный экстракт выпаривали на роторном испарителе, затем осадок растворяли в 2 мл гексана. Гексановый экстракт трехкратно очищали дистиллированной водой в делительной воронке, затем подвергали метилированию 0,2 мл раствором метилата натрия. Верхний метилированный слой отбирали в хроматографические виалы. Условия хроматографирования: Выдержка при 45 С в течение 2 мин, подъем температуры со скоростью 9 гмин до 300С. Выдержка 10 мин при 300 С. Хроматограф 7820 А с селективным масс-спектрометрическим детектором HP 5975 фирмы «Agilent Technologies». Энергия ионизации – 70 эВ. Температура сепаратора –280 °С, ионного источника – 230 °С. Кварцевая колонка 30000 × 0,25 мм со стационарной фазой (95% диметил – 5% дифенилполисилоксан). Идентификацию компонентов осуществляли с использованием библиотеки масс-спектров «NIST11». Идентифицированные соединения представляют собой смесь насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, а также эйкозаноидов (лейкотриенов, простагландинов и тромбоксанов). В то время как большинство эйкозаноидов способствуют воспалению, некоторые также действуют для его устранения (то есть являются противовоспалительными). Арахидоновая кислота является одной из наиболее распространенных жирных кислот в головном мозге и присутствует в аналогичных количествах с ДНА (докозагексаеновой кислотой). Среди прочего арахидоновая кислота помогает поддерживать текучесть клеточной мембраны гиппокампа, защищающего мозг от окислительного стресса, активирующего рецептор пероксисомального пролифератора. АРА также активирует синтаксин-3 (STX-3), белок, участвующий в росте и восстановлении нейронов. Таким образом, впервые в России был оценен фармацевтический потенциал истинных трюфелей, обитающих на территории России, а также выполнен задел для дальнейших исследований экстрактов в области поиска нейроактивных соединений.

Работа проведена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственная регистрация 121111100025-5) и гранта Президента Российской Федерации № МК–1245.2021.1.4.



РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

Мун В.В.

ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

valeriy2125@gmail.com

Клетки Сертоли (КС) – соматические клетки играющие ключевую роль в сперматогенезе. Однако, КС обладают плохой пролиферацией в культуре, из-за чего поиск их высокопролиферативных аналогов является актуальной задачей. Так, нашей лабораторией была найдена популяция Сертоли-подобных клеток (СПК). А обладает схожим с КС профилем экспрессии, но отличается повышенной пролиферативной активностью и сниженной экспрессией *Dmrt1* – транскрипционного фактора, важного для поддержания КС в дифференцированном состоянии.

Целью текущей работы является разработка методики для оценки функциональной активности СПК в условиях *in vivo* семенника. Для этого мы удаляли КС из извитых семенных канальцев при помощи катионного детергента хлорида бензалкония, с последующей трансплантацией донорских СПК в обработанный семенник.

Согласно нашей методике, удаление КС осуществляется путем инъекции раствора детергента в извитые семенные канальцы при помощи стеклянного микрокапилляра. Для подбора оптимальной концентрации хлорида бензалкония была протестирована серия разведений от 0,02%, до 0,15%, эффективность которых оценивали на 4 сутки после операции. Анализ, проведенный посредством гематоксилин-эозиновой окраски и иммунофлуоресцентной окраски на маркер КС и СПК – *Sox9*, показал, что эффект от инъекции вещества заключается в снижении сперматогенного эпителия и гибели КС, при этом оптимальной концентрацией была выбрана 0.1%, поскольку вызывает нарушение порядка трети извитых семенных канальцев. Нарушенными считались канальцы с 0-4 клетками Сертоли на поперечный срез, нормальными – с 28-30 клетками.

Далее, на 4 сутки после инъекции хлорида бензалкония проводилась трансплантация культуры СПК. Клетки в виде суспензии инъецировались вновь в сеть семенника, с последующим анализом на 4, 14 и 28 сутки. В результате было установлено, что СПК остаются жизнеспособными в яичках реципиента, как минимум в течение 4-х недель, при этом заполняя свободные от КС семенные канальцы и расплываясь по базальной мембране. Трансплантированные клетки имеют отросчатую структуру, схожую с нативными КС в сперматогенном эпителии и сохраняют экспрессию типичных для КС транскрипционных факторов, таких как *Sox9* и *Dmrt1*. *Rax 8* – маркер СПК тоже сохраняет свою экспрессию.

Таким образом, мы получили тестовую систему, которая позволяет оценить функциональную активность СПК в условиях, максимально приближенных к нативным, что может помочь в исследовании взаимодействия ниши сперматогониальных стволовых клеток с соматическими клетками и разработке методов лечения мужского бесплодия.



ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА НА НЕМАТОДУ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

Самусева П.Д.¹, Орлов Ю.А.², Мехова А.А.³

¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Polina.Samuseva@spcpi.ru

В настоящее время применение наночастицы серебра (AgNPs) в химической и фармацевтической отрасли. Это обусловлено бактерицидными и противовирусными свойствами AgNPs. Считается, что AgNPs безопасны для высших эукариотов. Исследований их токсичности в отношении малых, свободно живущих организмов, пока недостаточно. В водных растворах AgNPs являются источником ионов серебра Ag(I), которые изоэлектронны ионам Cu(I) и поэтому связываются транспортерами Cu(I), переносятся к формирующимся купроэнзимам, или к медь-зависимым регуляторным факторам, и замещают в них Cu. Замещение Cu(I) ионами Ag(I) нарушает баланс меди в организме и способствует развитию нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Целью данной работы является исследование токсического эффекта AgNPs на штамм дикого типа нематоды *C. elegans*. *C. elegans* – это свободноживущая нематода длиной около 1 мм. Благодаря короткому жизненному циклу, простоте содержания, малым размерам, прозрачности и способности производить многочисленное потомство *C. elegans* является распространенным модельным организмом для биологических исследований. В настоящей работе исследовали влияние AgNPs, полученных путем восстановления серебра из раствора AgNO₃ гидразином в мицеллах, которые образованы олеатом калия. По данным UV/vis-спектроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии и лазерной дифрактометрии, полученные AgNPs состоят из кристаллического серебра, имеют сферическую форму и размер 30-40 нм. Скорость развития нематод штамма N2 изучали на чашках Петри с агаризованной средой NGM с различными концентрациями AgNPs: 0; 0,5; 1; 4; 6 мкг/мл. Для этого взрослых особей помещали на чашки Петри и оставляли примерно на 1 час, чтобы они отложили около 50 яиц, затем чашки с полученными яйцами инкубировали в течение 56 часов при температуре 20°C. На каждой чашке определяли стадию развития нематод и рассчитывали долю нематод, достигших стадии развития L4, от общего числа червей на чашке. На чашках с концентрациями AgNPs в интервале 0-0,5 мкг/мл штамм дикого типа N2 демонстрировал нормальную скорость развития. Статистически значимая задержка в развитии наблюдалось при концентрации 1 мкг/мл и выше. Можно сделать вывод о том, что высокие концентрации AgNPs в среде (от 1 мкг/мл и выше) оказывают токсический эффект на онтогенез *C. elegans*, который выражается в задержк развития.

Работа поддержана грантом РФФ № 20-74-10087.



ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРЕГНАН X РЕЦЕПТОРА

Сеидкулиева А.А., Ганина С.О., Шулькин А.В.

ФГБОУ ВО РязГМУ имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Рязань, Россия

adamiana@inbox.ru

Прегнан X рецептор (PXR) – ядерный рецептор, играющий важную роль в регуляции экспрессии ферментов биотрансформации и обмена веществ, а также белков-транспортёров. PXR локализуется главным образом в кишечнике и печени. Окислительный (ОС) и нитрозативный стресс (НС) могут способствовать нарушению биохимических и физиологических процессов.

Целью настоящего исследования стала оценка активности PXR в условиях ОС и НС.

Исследование выполнено на линии клеток Caco-2.

ОС моделировали добавлением в питательную среду H_2O_2 в концентрациях 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 мкМ. В контрольной серии клеткам добавляли в питательную среду воду для инъекций в эквивалентном объеме. НС моделировали добавлением S-нитрозоглутатиона (GSNO) в питательную среду в концентрациях 1, 10, 50, 100, 500 мкМ. В контрольной серии клетки инкубировали с питательной средой без тестируемого вещества. Клетки инкубировали в течение 3, 24, 72 ч. В качестве контроля индукции PXR дополнительно проводили инкубирование клеток Caco-2 с рифампицином в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч. Количество PXR определяли методом вестерн-блот.

Классический индуктор PXR – рифампицин вызывал увеличение количества PXR по сравнению с контролем. Воздействие H_2O_2 на клетки линии Caco-2 в течение 3 ч не влияло на количество PXR, данный показатель достоверно не отличался от значений контроля. Увеличение длительности экспозиции с прооксидантом до 24 ч вызывало повышение количества PXR при концентрации H_2O_2 10, 50 и 100 мкМ. Увеличение длительности воздействия до 72 ч сопровождалось нормализацией уровня PXR при концентрации H_2O_2 0.1–10 мкМ и его снижением при концентрации 50 и 100 мкМ по сравнению с контролем. При концентрации пероксида водорода 100 мкМ и длительности инкубации 72 ч отмечалось расщепление бэнда PXR. Инкубирование клеток с 1, 10, 100 и 500 мкМ GSNO в течение 3 ч приводило к снижению количества PXR по сравнению с контролем. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч сопровождалось повышением количества PXR при концентрации GSNO 1, 10, 50 мкМ. При концентрации GSNO 100 мкМ уровень PXR достоверно не отличался от показателей контроля, а в концентрации 500 мкМ был его ниже него. Продление инкубации до 72 ч приводило к нормализации уровня PXR при концентрации GSNO 1 мкМ и к его снижению в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ.

Таким образом, развитие ОС и НС в течение 24 ч приводит к повышению количества PXR, а увеличение длительности экспозиции нивелирует данный эффект.



ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ЛИГАНДОВ ГЛУТАМАТНЫХ NMDA-РЕЦЕПТОРОВ НА МОДЕЛИ КОРАЗОЛОВЫХ И НИКОТИНОВЫХ СУДОРОГ У МЫШЕЙ

Ситдикова К.К.^{1,2}, Яковлева Е.Е.^{2,3}, Бычков Е.Р.²

¹ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский
университет, Санкт-Петербург, Россия

sitdikova.kk@gmail.com

NMDA-рецепторы – это глутамат-управляемые катионные каналы, обладающие множеством жизненно важных функций. Эти рецепторы критически важны для правильной работы мозга и участвуют в генерации импульсов, которые отвечают за основные процессы нашего организма, включая дыхание и движение. Нарушения в глутаматергической нейротрансмиссии связаны со множественными болезнями, например болезнью Паркинсона и судорожными расстройствами. Это делает NMDA-рецепторы важной фармакологической мишенью, а разработка препаратов, модулирующих их работу, остается одной из наиболее актуальных проблем современной нейрофармакологии. Несмотря на потенциально широкий спектр применения лигандов NMDA-рецептов (в качестве противосудорожных, противоишемических, анальгетиков и т.д), их применение сильно ограничено ввиду наличия у них психотомиметического и нейротоксического эффекта.

Целью нашего исследования являлось изучение противосудорожной активности нового лиганда NMDA-рецепторов – препарата ИЭМ-2044 (производного фенциклидина) на модели коразоловых и никотиновых судорог у мышей.

Тестируемый препарат вводили внутривенно в дозе 5-20 мг/кг за 15 минут до введения конвульсанта. В качестве препарата сравнения в модели коразол-индуцированных судорог использовали каналоблокатор мексалан. Судороги регистрировали в течение 30 минут после введения конвульсанта. Фиксировали продолжительность тонико-клонических судорог и частоту летальных исходов. Дополнительно при введении никотина регистрировались показатели: поза Штрауба, «дикий бег», тремор.

В результате было выявлено, что ИЭМ-2044 в дозах 5-20 мг/кг на модели коразол-индуцированных судорог уменьшает длительность судорог. Однако только введение минимальной дозировки уменьшило вероятность летального исхода и только в данной дозировке препарат оказался эффективнее мексалана.

При введении никотина интенсивность судорог не изменялась, однако летальный исход практически во всех группах снизился по сравнению с контролем. Также уменьшился процент мышей, у которых в принципе развивались судороги. Интенсивность судорог, дикий бег и поза Штрауба также проявлялись слабее по сравнению с контролем.

Таким образом, можно говорить о способности препарата ИЭМ-2044 оказывать дозозависимое противосудорожное действие и необходимости проводить дальнейшие исследования данного соединения.



СТИМУЛИРУЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ 5-АМИНО-N-ТРЕТ-БУТИЛ-2-(МЕТИЛСУЛЬФАНИЛ)-4-(3-(НИКОТИНАМИДО)ФЕНИЛ)ТИЕНО[2,3-D]-ПИРИМИДИН-6-КАРБОКСАМИДА НА СТЕРОИДОГЕНЕЗ У САМЦОВ КРЫС С РАЗЛИЧНЫМИ МОДЕЛЯМИ ДИАБЕТА

**Степochкина А.М.¹, Бахтюков А.А.¹, Деркач К.В.¹, Лебедев И.А.¹,
Сорокоумов В.Н.^{1,2}, Шпаков А.О.¹**

¹ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

annastepochkina23.11@mail.ru

Оба, инсулин-дефицитный и инсулин-независимый сахарный диабет (СД), сопровождаются нарушениями функций репродуктивной системы. У мужчин это выражается в снижении продукции тестостерона, развитии гипогонадотропных состояний, ослаблении сперматогенной функции. Для коррекции стероидогенеза используют препараты гонадотропинов, в большинстве случаев хорионический гонадотропин человека (ХГЧ), являющийся структурным и функциональным гомологом лютеинизирующего гормона (ЛГ). ХГЧ специфично связывается с рецептором ЛГ (ЛГР). Длительное применение препаратов гонадотропинов вызывает резистентность к ним семенников и, как следствие, ослабляет их стимулирующее влияние на стероидогенез, что наиболее отчетливо выражено при СД. Другим подходом для стимуляции стероидогенеза может быть использование гетероциклических соединений с активностью аллостерических ЛГР-агонистов. Цель работы состояла в изучении влияния 5-амино-N-трет-бутил-2-(метилсульфанил)-4-(3-(никотинамидо)фенил)тиено[2,3-d]-пиримидин-6-карбоксамид (ТП03) на тестикулярный стероидогенез у самцов крыс со стрептозотоцин-индуцированным СД 1-го типа и с диета-индуцированным СД 2-го типа. Изучали однократное и пятидневное введение ТП03 в суточной дозе 15 мг/кг. ТП03 синтезировали с помощью ацилирования его прекурсора – 5-амино-4-(3-аминофенил)-N-трет-бутил-2-(метилсульфанил)тиено[2,3-d]-пиримидин-6-карбоксамид. У самцов крыс были исследованы уровни тестостерона в крови и семенниках, содержание предшественников тестостерона и экспрессия стероидогенных генов в семенниках. Оба варианта введения ТП03 достоверно повышали уровни тестостерона в крови и семенниках диабетических крыс, а также увеличивали в семенниках экспрессию генов, кодирующих холестерин-транспортирующий белок StAR и цитохром CYP17A1. Стероидогенный эффект ТП03 сохранялся и даже усиливался в течение его пятидневного введения, будучи сравнимым с таковым у контрольных крыс, в то время как эффект ХГЧ (20 МЕ/крысу/сут) снижался. В отличие от ХГЧ, ТП03 нормализовал сниженную при СД тестикулярную экспрессию гена, кодирующего ЛГР, что указывает на вызываемое им восстановление чувствительности семенников к гормональной стимуляции. Таким образом, ТП03 можно рассматривать, как перспективный препарат для восстановления стероидогенеза при СД 1-го и 2-го типов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-20122). ¹H-ЯМР и масс-спектрометрические исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ.



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ ЦИТОСКЕЛЕТНЫХ СТРУКТУР В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОЖИ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГЕНТИНГТОНА

Таран А.С.^{1,2}, Беликова Л.Д.^{1,3}, Лагарькова М.А.³, Алиева И.Б.^{2,3}

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия;

²НИИ ФХБ им. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия

Eva8326@yandex.ru

Болезнь Гентингтона (БГ) – врожденное, ныне неизлечимое нейродегенеративное заболевание. Причиной развития является экспансия ЦАГ-повторов в гене белка гентингтина (НТТ). Первые симптомы чаще развиваются в старшем возрасте, однако показано, что возраст манифестации заболевания зависит от количества ЦАГ-повторов в гене. При этом НТТ экспрессируется во всех тканях млекопитающих. Функции НТТ описаны недостаточно, возможно его участие во многих клеточных процессах, в том числе в везикулярном транспорте, делении и др. В настоящей работе использовали две модели БГ: (1) первичные культивируемые фибробласты кожи, полученные из биоптатов пациентов с БГ с разным количеством повторов и соответствующих им здоровых доноров; (2) изогенная линия фибробластов с 69 ЦАГ-повторами в гене НТТ, полученная из эмбриональных фибробластов человека. Методом микроскопии сверхвысокого разрешения SIM исследовали морфологические нарушения в архитектуре цитоскелета: микротрубочек (МТ) и актиновых микрофиламентов (АФ). Оказалось, что морфологически архитектура сети МТ и β -/ γ -АФ в клетках больных и здоровых не отличается, но нарушается взаимное расположение и степень колоколизации. Используя 3D реконструкции SIM-изображений анализировали нарушения в строении, ориентации и длине первичной реснички. Оказалось, что в G₀-фазе клеточного цикла первичные реснички в фибробластах пациентов с БГ в среднем встречались реже, чем в клетках здоровых доноров, но имели большую длину. В работе исследовали нарушения подвижности фибробластов кожи больных БГ методом прижизненных наблюдений (распластывание и выползания клеток в экспериментальную рану). Оказалось, что фибробласты больных имеют короткую стадию распастывания и формируют длинные тонкие выросты ламеллы. Такой фенотип может формироваться из-за нарушений процесса формирования клеточных контактов, эта гипотеза была проверена в ходе исследования. При выползании в экспериментальную рану клетки пациентов с БГ двигались быстрее и более хаотично, чем клетки здоровых доноров. Предположительно, это может быть связано с появлением большого количества экспрессирующих α -гладкомышечный актин фибробластов у пациентов с БГ. Суммируя полученные данные можно заключить, что мутации в гене НТТ оказывают влияние на различные цитоскелетные структуры, однако остается множество вопросов о роли гентингтина в процессах функционирования и реорганизации элементов цитоскелета. Полученные результаты впервые демонстрируют разноплановость эффектов мутации в НТТ на цитоскелет клетки, клеточную морфологию и физиологию. Поддержано программой развития МГУ (PNR 5.13.).



ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В КАЧЕСТВЕ ЗАМЕНЫ КСЕНОГЕННОЙ СЫВОРОТКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Токтохоева Л.Н.¹, Гунтупова К.В.¹, Дармаев Э.О.¹, Виноградов В.А.¹, Будаев Э.Ц.¹,
Абашеев Р.Ю.¹, Долодоев А.С.², Цыбденова А.П.², Балханов Ю.С.²**

¹ФГБОУ ВО Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова,
Улан-Удэ, Россия;

²ООО «МИП «Байкальский центр биотехнологий», Улан-Удэ, Россия

lyubov2316@mail.ru

Пуповинная кровь – это кровь, сохранившаяся в плаценте и пуповинной вене после рождения ребенка, содержит высокое количество кроветворных (гемопоэтических) стволовых клеток, сходные с их содержанием в костном мозге, а также факторов роста, таких как цитокины, TGF- β , интерлейкины. В регенеративной медицине использование сыворотки пуповинной крови и лизата тромбоцитов находит все более широкое применение в связи с поиском оптимального состава сред для культивирования клеток, предназначенных для клинического применения и не содержащих ксеногенных компонентов.

Цель работы: определить влияние лизата тромбоцитов пуповинной крови на рост мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика человека *in vitro*.

Методы исследования: забор пуповинной крови производили у рожениц с проверенным статусом в контейнеры для пуповинной крови с содержанием 100 мл ЦФДА-1. Двухэтапное центрифугирование пуповинной крови проводили в пробирках объемом 50 мл при 500g в течение 10 минут и при 700g 20 минут. Криодеструкцию полученных тромбоцитов в фосфатно-солевом буфере (1:1) осуществляли при -20°C не менее 48 часов. Размороженные и ресуспендированные образцы лизата тромбоцитов центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 15 минут и привносили в бессывороточную среду. Выделение стромальных мезенхимальных стволовых клеток осуществляли из вартонова студня пупочного канатика человека ферментативным способом и эксплантами.

Результаты: показан пролиферативный и дифференцировочный отклик мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика человека при добавлении 10% лизата тромбоцитов пуповинной крови в среду культивирования.

Заключение: Проведена оценка эффективности использования лизата тромбоцитов пуповинной крови человека в качестве добавки к питательной среде при культивировании мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из пупочного канатика человека. Установлено, что внесение тромболизата пуповинной крови в специализированную питательную среду для культивирования стволовых клеток обеспечивает получение качественного клеточного трансплантата в те же сроки, что и при культивировании с дорогостоящей сывороткой (эмбриональная телячья сыворотка). Полученные данные позволяют рекомендовать использование лизата тромбоцитов пуповинной крови в качестве альтернативы ксеногенной сыворотки в клинических и лабораторных протоколах.



ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ УРИДИНА НА МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У КРЫС, ВЫЗВАННОЙ ВВЕДЕНИЕМ НЕЙРОТОКСИНА 6-ОНДА

Успаленко Н.И., Мосенцов А.А., Хмиль Н.В.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

nina_uspalenko@mail.ru

Несмотря на многочисленные исследования болезни Паркинсона, точный механизм развития заболевания до сих пор неизвестен. Считается, что окислительный стресс является ключевым фактором развития дегенерирующего каскада дофаминергической нейродегенерации. В настоящей работе мы использовали уридин, метаболический предшественник природного активатора АТФ-зависимого калиевого канала митохондрий (митокАТФ) – уридиндифосфата для лечения синдрома Паркинсона (СП), вызванного введением нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-ОНДА).

Модель СП создавалась двухсторонним стереотаксическим введением 6-ОНДА непосредственно в компактную часть чёрной субстанции мозга крыс. Исследование проведено на 20 самцах крыс линии Wistar, составивших четыре равные группы: контрольная ложнооперированная группа; группа с введённым 6-ОНДА (12 мкг/особь); группа, вместе с 6-ОНДА, получавшая в постоперационный период (в течении 28 дней) внутривентрикулярные инъекции уридина (30 мг/кг); группа, получавшая вместе с 6-ОНДА и уридином инъекции блокатора митокАТФ 5-гидроксидеканоата (5-ГД, 5 мг/кг). Тесты проводились через 4 недели после операции. В группе с воссозданным СП без лечения поведенческий тест на моторную координацию «Ротарод» показал уменьшение двигательной активности на 82,3% по сравнению со значениями контрольной группы. Скорость образования H_2O_2 митохондриями мозга была выше на 23%. Содержание перекисей липидов малонового диальдегида в митохондриях мозга на 18% выше, чем в контрольной группе. При исследовании дыхания митохондрий установлено, что дыхательный контроль (ДК) снижается на 61,0%, а время фосфорилирования добавленного АДФ увеличивалось на 39,6%. Введение уридина приводит к восстановлению, хотя и неполному, влиянию нейротоксина на двигательную активность, причём положительный эффект не снимался введением 5-ГД. Скорость образования перекисей и содержание перекисей малонового диальдегида, повышенное при введении нейротоксина, снижается по отношению к значениям группы без лечения. Ингибитор митокАТФ частично снижает защитный эффект уридина. Значения ДК и время фосфорилирования при введении уридина восстанавливаются почти до нормы, а ингибитор канала устраняет положительный эффект уридина. Таким образом, в работе установлено, что АТФ-зависимый калиевый канал митохондрий участвует в защите организма от окислительного стресса, наблюдаемого на модели болезни Паркинсона, вызванного введением нейротоксина. Полученные данные о защитном воздействии уридина могут быть использованы при разработке методов лечения болезни Паркинсона.



РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНО-АППАРАТНОГО КОМПЛЕКСА ВИДЕОТРЕКИНГА ГРЫЗУНОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИХ ПОВЕДЕНИЯ

Феофилактова Т.О.

ФГАОУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет,
Пермь, Россия

feotanya.15@gmail.com

В настоящее время можно считать видеотрекинг базовым методом, который применяется при оценке общей локомоторной активности животного. В то же время большинство существующих разработок видеотрекинга обладают рядом ограничений, поэтому при ведении и записи данных необходимо присутствие человека во время регистрации поведения животных: субъективная запись по-прежнему требуется для выделения поз животного, различных видов поведения, таких как умывание (груминг), стойки и других видов.

Целью нашего исследования являлось создания программно-аппаратного комплекса, направленного на увеличение автоматического распознавания классов поведения лабораторных грызунов.

В тестовой установке камеры расположены друг относительно друга перпендикулярно. Разрешение камер: 340×260 и больше. Такое расположение камер в экспериментальной установке, представляющего собой прозрачный стеклянный куб, стороны которого – 30-40 см, позволит точнее рассмотреть позы животного во время проведения эксперимента.

Программная часть комплекса, написанная с помощью языка Python, представляет собой свёрточную нейронную сеть. Вручную полученные в ходе эксперимента картинки, по которым определяется поза грызуна, были разнесены по 10 классам. Изначально в каждом классе (за исключением двух) было представлено по 250 картинок, затем для увеличения точности производилась аугментация данных.

Результатом нашего исследования являлось достижение точности распознавания валидационной выборки по 10 классам поведения у разрабатываемого программного продукта до 98,8%.

Из представленных на рынке продуктов, для оценки конкурентоспособности разрабатываемого продукта, были выбраны следующие товары, обладающие наиболее близкими к разрабатываемому продукту характеристиками: ANY-maze (производитель – Stoelting) и EthoVisionXT (производитель – Noldus Information Technologies). Преимуществами разрабатываемого продукта являются увеличение точности распознавания поведения по классам на 27,8%, отображение более полной картины поведения животного на 2-8 параметра и использование взаимно перпендикулярных трех камер, что приведет к получению большего количества информации о поведении испытуемого животного.



СУБСТАНЦИЯ НА ОСНОВЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ТЕРАПИИ СЕБОРЕЙНОГО ДЕРМАТИТА: РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ

Филатов В.А., Куляк О.Ю., Каленикова Е.И.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

fivitya@yandex.ru

Дерматологические заболевания кожи головы и волос в значительной мере влияют на качество жизни людей. По оценкам специалистов, себорейный дерматит (СД) распространен более чем в 50% популяции и встречается у 42% новорожденных детей в первые три месяца жизни [1]. Нозология включена в МКБ под шифром L21 [2], является самым распространенным дерматологическим заболеванием кожи головы в мире. Основной группой средств для лечения себорейного дерматита кожи головы являются синтетические антимикробные субстанции, однако их регулярное использование нарушает биоразнообразие микрофлоры кожи головы и определяет резистентность микроорганизмов. Ведется поиск новых активных субстанций растительного происхождения для лечения себорейного дерматита.

Были выбраны три наиболее перспективных вещества в терапии себорейного дерматита: эфирное масло листьев *M. alternifolia*, 1,8-цинеол (эвкалиптол) и α -(-)-бисаболол. Данные субстанции являются природными производными терпенов с антимикробным действием в отношении микроорганизмов, ответственных за патогенез себорейного дерматита. Биологическая активность обусловлена их высокой липофильностью и изменением структуры клеточных мембран микроорганизмов. Соединения были первично протестированы на стандартных штаммах *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 14990 и *C. albicans* ATCC 10231 по методике, описанной в [3]. Установлена различная антимикробная активность индивидуальных соединений со значением МИС от 1.25 до 40.00 мг/мл. 1,8-цинеол (эвкалиптол) является усилителем проникновения веществ в клетки микроорганизмов. Комбинация данных веществ в одну субстанцию позволяет добиться значительного снижения МИС и индекса синергизма FICI <0.5. Полученная композиция обладает повышенной антимикробной активностью и представляет интерес для дальнейшего изучения.

Литература.

1. Borda L.J., Wikramanayake T.C. Seborrheic Dermatitis and Dandruff: A Comprehensive Review J. Clin. Investig. Dermatol, 2015, 3(2), 1-22.
2. https://medi.ru/klinicheskie-rekomendatsii/dermatit-seborejnyj_13921/ (Дерматит себорейный. Клинические рекомендации: утв. Российским обществом дерматовенерологов и косметологов на XVI Всероссийском Съезде дерматовенерологов и косметологов 16.06.2016).
3. Sharafutdinov, I.S., Trizna, E.Y., Baidamshina, D.R. et al. Antimicrobial effects of sulfonyl derivative of 2(5H)-furanone against planktonic and biofilm associated methicillin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus*. Front. Microbiol, 2017, 8, 1-12.



СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ РЕЦЕПТОРА ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА КРЫСЫ

**Фокина Е.А.¹, Деркач К.В.¹, Бахтюков А.А.¹, Сорокоумов В.Н.^{1,2},
Степочкина А.М.¹, Шпаков А.О.¹**

¹ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

fokina-katrina@yandex.ru

Тиреотропный гормон (ТТГ) является важнейшим регулятором тиреоидной системы, взаимодействуя с рецептором ТТГ (ТТГР) в щитовидной железе и стимулируя продукцию тиреоидных гормонов. В клинике ТТГ и его аналоги применяются исключительно редко, что обусловлено их значимыми побочными эффектами. Вследствие этого разработка регуляторов ТТГР является актуальной задачей эндокринологии, причем востребованы как стимуляторы ТТГР, например, для повышения накопления радиоактивного йода при терапии рака щитовидной железы, так и ингибиторы ТТГР, требуемые для лечения болезни Грейвса. Наибольший интерес среди возможных лигандов ТТГР представляют низкомолекулярные регуляторы, воздействующие на аллостерический сайт ТТГР. Целью исследования были разработка, синтез и изучение биологической активности тиено[2,3-d]-пиримидиновых производных с активностью полных и инверсионных агонистов и нейтральных антагонистов ТТГР. По результатам молекулярного докинга и тестирования на клеточных культурах тироцитов были отобраны и синтезированы, а затем изучены в условиях *in vivo* 3 новых соединения с активностью аллостерических ТТГР-регуляторов. Показано, что внутрибрюшинное введение крысам 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(4-йодофенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]-пиримидин-6-карбоксамида (**1**) и 5-амино-N-(трет-бутил)-4-(4-(3-метоксипроп-1-ин-1-ил)фенил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]-пиримидин-6-карбоксамида (**2**) (15 мг/кг) снижает стимулированные тиролиберином, релизинг-фактором ТТГ, уровни тиреоидных гормонов в крови самцов крыс Вистар. В щитовидной железе соединения **1** и **2** ингибировали стимулированную тиролиберином экспрессию генов *Tg*, *TPO* и *Dio2*. Другое соединение, этил-2-(4-(4-(5-амино-6-(трет-бутилкарбамоил)-2-(метилтио)тиено[2,3-d]-пиримидин-4-ил)фенил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)ацетат (**3**), вводимое внутрибрюшинно (15 мг/кг), повышало уровень тиреоидных гормонов и экспрессию генов *Tg*, *TPO* и *Dio2* в щитовидной железе крыс. Предварительная обработка соединением **3** увеличивала стимулированную тиролиберином продукцию тиреоидных гормонов и экспрессию генов *TPO* и *Dio2*. Таким образом, разработаны новые аллостерические ТТГР-регуляторы с активностью полного (**3**) и инверсионного агонистов (**1**) и нейтрального антагониста (**2**), которые можно рассматривать, как прототипы лекарств для лечения заболеваний щитовидной железы.

Работа выполнена при поддержке РНФ № 19-75-20122. Физико-химический анализ тиено[2,3-d]-пиримидинов проводили с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ.



ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ПОЛИСАХАРИДНЫХ КОМПОЗИТНЫХ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

Фомичёв И.А.^{1,2}, Винник Д.А.^{1,3}, Давыдова Г.А.¹

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
биотехнологический факультет, Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО Самарский национальный исследовательский университет
им. академика С.П. Королева, Самара, Россия

ilya_fa@mail.ru

Для исследования взаимодействия альгината натрия (А) с другими полисахаридами, такими как метилцеллюлоза (М), каррагинан (К), гуаровая (Г) и ксантановая (КК) камеди, готовили смеси с различным объемным соотношением компонентов. При этом суммарная концентрация смешанного раствора по полимеру оставалась равной 2 масс. %: 0/100, 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 60/40, 70/30, 80/20, 90/10 и 100/0.

Были исследованы реологические характеристики комплексов и их рН. О совместимости водных растворов полисахаридов можно судить по степени отклонения экспериментальной зависимости «вязкость – состав» от теоретической, где вязкость смеси является аддитивной величиной. При этом принято считать, что условию аддитивности отвечает прямая, соединяющая на диаграмме ординаты, отвечающие величинам вязкости растворов чистых компонентов смеси. Наибольшая совместимость получена для смесей (А)/(М), для которых в значительном диапазоне составов наблюдается положительное отклонение вязкости от аддитивных величин. Этот факт может свидетельствовать в пользу образования лабильных гетероагрегатов. Для растворов (А)/(Г) и (А)/(К) получено отрицательное отклонение значений вязкости от аддитивных величин, что свидетельствует об ограниченной совместимости этих полимеров в водном растворе. Это, по-видимому, связано с электронейтральностью гуаровой камеди и присутствием крупных заместителей в случае каррагинана. Для растворов (А)/(КК) в диапазоне составов 10/90, 20/80, 30/70 и 40/60 наблюдается наибольшее положительное отклонение вязкости от аддитивных величин и говорит о взаимодействии этих полисахаридов посредством водородных связей, что подтверждается литературными источниками.

У полученных бинарных растворов (А) измерены значения рН, находящиеся в диапазоне 6,5–6,9.

Цитотоксическую активность полученных бинарных соединений альгината натрия изучали методом МТТ на кератиноцитах линии HaCat. Все гели не оказывают угнетающего воздействия на клетки. Также адгезия клеток увеличивается в точках взаимодействия полисахаридов.



ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НУКЛЕОПЕПТИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ С миРНК СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ АНИОННЫМИ ПЕПТИДАМИ

Фрейд С.А.¹, Штыкалова С.В.^{1,2}, Маретина М.А.²

¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБНУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, Россия

svetafreundmax@gmail.com

Разработка невирусных средств доставки нуклеиновых кислот является одним из многообещающих и перспективных направлений в генной терапии. Ранее нами были разработаны модульные аргинин-цистеин-богатые поликонденсированные носители R6p и R6p-RGD для доставки пДНК и миРНК в клетки млекопитающих. Однако, данные носители в большинстве случаев не обеспечивали их защиту от анионных компонентов сыворотки крови. Чтобы повысить стабильность и трансфекционную активность исследуемых комплексов в присутствии сыворотки в среде комплексы были покрыты анионными пептидами богатыми глутаминовой кислотой (E6, E6p, E6p-RGD), поскольку аналогичный подход был ранее успешно использован для доставки генов в эндотелиальные и раковые клетки.

Для оценки физико-химических свойств и степени конденсации комплексов использовали интеркалирующий краситель SYBR Green. Также были определены размеры и дзета-потенциал комплексов при оптимальном зарядовом соотношении миРНК/носитель 1/16. Для оценки токсического эффекта исследуемых комплексов на культуру клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231-GFP⁺ был использован резазуриновый тест. Было показано, что все исследованные комплексы не проявляют токсичность по отношению к данной культуре клеток. Трансфекционные свойства данных нуклеопептидных комплексов также были исследованы на культуре клеток MDA-MB-231-GFP⁺.

В результате проведенного исследования был сделан вывод о том, что при оптимальных зарядовых соотношениях миРНК/катионный пептид/анионный пептид возможна стабилизация нуклеопептидных комплексов, что приводит к повышению их трансфекционной активности в среде с сывороткой крови.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-15-00111.



ПИОГЛИТАЗОН – СЛАБЫЙ РАЗОБЩИТЕЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И МОДУЛЯТОР НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ Ca^{2+} -ЗАВИСИМОЙ
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ (mPTP)

**Харечкина Е.С.¹, Никифорова А.Б.¹, Белослудцев К.Н.^{1,2,3}, Рокитская Т.И.¹,
Антоненко Ю.Н.¹, Круглов А.Г.¹**

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия;

²ФГБОУ ВО Марийский государственный университет, Йошкар-Ола, Россия;

³НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

katya.kypri@gmail.com

Пиоглитазон (PIO) является инсулин сенсibiliзирующим препаратом (класс тиазолидиндионов), который широко применяется для лечения диабета 2-го типа. Известно, что PIO может стимулировать сердечную и печеночную недостаточность, а также хронические заболевания почек. Однако механизмы побочного действия препарата не известны. Некоторые данные указывают на то, что они задействуют открывание неспецифической кальций-зависимой митохондриальной поры (mPTP). При этом структура молекулы PIO допускает наличие свойств, присущих протонофорам, способным проникать через мембраны как в протонированной, так и анионной форме. Поэтому целью настоящего исследования была оценка протонофорного, разобщающего и mPTP-стимулирующего эффектов PIO в разных моделях *in vitro*.

В качестве объекта исследования были использованы изолированные митохондрии и цитозольная безъядерная фракция гомогената печени, а также изолированные тимоциты самцов крыс линии Wistar. С помощью тетрафенилфосфониевого электрода, а также флуоресцентного красителя родамина 123 было исследовано влияние PIO на мембранный потенциал митохондрий. Сопряжение окисления и фосфорилирования было установлено полярографическим методом. Транспорт ионов и растворов через мембраны регистрировали с помощью потенциометрических и спектральных методик. Открывание mPTP измеряли спектрофотометрически путем регистрации набухания митохондрий, а также путем измерения их кальциевой емкости с помощью кальциевого электрода.

Было обнаружено, что PIO снижает мембранный потенциал в изолированных митохондриях и интактных тимоцитах, а также уменьшает эффективность фосфорилирования ADP после добавки кальция. Присутствие цитозольной безъядерной фракции смягчало деполяризацию митохондрий, но делало ее устойчивой. Карбоксиатрактилозид (ингибитор транспортера адениновых нуклеотидов ANT) снижал вызванную PIO деполяризацию. PIO активировал транспорт протонов в дезэнергизованных митохондриях, но не в искусственных фосфолипидных везикулах. Также PIO не влиял на вход катионов калия и кальция в митохондрии, но резко снижал способность митохондрий удерживать накопленный кальций в матриксе. Кроме того, была обнаружена способность PIO сильно уменьшать ингибиторное действие адениновых нуклеотидов, оказываемое на mPTP.

Таким образом, было показано, что PIO является слабым, частично зависимым от работы транспортера ANT разобщителем, а также модулятором продукции АТФ и чувствительности mPTP к кальцию и адениновым нуклеотидам. Данные свойства PIO могут вносить вклад как в его терапевтические, так и побочные эффекты.



НАНОКОМПОЗИТ ДИОКСИД ЦЕРИЯ – КАЛЬЦЕИН ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ АФК *IN VITRO*

Чукавин Н.Н.^{1,2}, Попов А.Л.²

¹ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова Москва, Россия;

²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия

chukavinnik@gmail.com

На сегодняшний день одним из наиболее эффективных и перспективных агентов для тераностики является нанодисперсный диоксид церия (НДЦ). Данный наноматериал обладает способностью имитировать активность ряда антиоксидантных ферментов за счет способности катализировать нейтрализацию активных форм кислорода (АФК) и других свободных радикалов. Молекулярный механизм биологической активности НДЦ обусловлен присутствием в его кристаллической решётке ионов церия в двухвалентных состояниях (Ce^{3+} и Ce^{4+}), а также кислородных дефектов (вакансий), за счёт которых обеспечивается протекание окислительно-восстановительных реакций на поверхности наночастиц. Модификация поверхности НДЦ флуоресцентным красителем кальцеином обеспечивает детекцию АФК непосредственно в клетке наряду с их инактивацией.

В рамках данной работы нами была изучена биологическая активность наноконпозита НДЦ – кальцеин. Нами было показано, что данный наноконпозит в широком диапазоне концентраций (от 10 мкМ до 10 мМ) не обладает цитотоксичностью по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам (МСК, линия ALP-1) и опухолевым клеткам (линия MNNG/Hos). Наноконпозит НДЦ – кальцеин в концентрациях от 10 мкМ до 1 мМ не снижает пролиферативную активность МСК и опухолевых клеток, проявляя выраженную антиоксидантную активность по отношению к ним и сохраняя высокий уровень их жизнеспособности в условиях окислительного стресса, индуцированного 1 мМ пероксидом водорода. Также наноконпозит в концентрации 1 мМ способен детектировать повышенный уровень АФК в обоих типах клеточных культур. При этом нами было обнаружено, что наноконпозит НДЦ – кальцеин проявляет дозозависимую генотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам, повышая уровень экспрессии генов, ответственных за антиоксидантные системы клетки, апоптоз, некроз и аутофагию. Также наноконпозит оказывает дозозависимое воздействие на экспрессию ряда генов, вовлечённых в метаболизм АФК, функционирование митохондрий и синтез некоторых эндогенных антиоксидантов мезенхимальных стволовых клеток.

Таким образом, наноконпозит представляет собой новый перспективный тераностический агент для фотодинамической диагностики и хемодинамической терапии патологических состояний, связанных с окислительным стрессом.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-74-00086.



ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ДРОЖЖЕВЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ПРОЯВЛЯЮЩИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ

Шуленина О.В.^{1,2}, Толстыко Е.А.¹, Яровой Б.Ф.¹, Полесскова Е.В.^{1,3}, Коневега А.Л.^{1,2,3}

¹ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального
исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Россия;

²ФГБУ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

shulenina_ov@pnpi.nrcki.ru

Проблема распространения устойчивости бактерий к известным антибиотикам ведет к необходимости поиска новых антимикробных соединений. Природное биоразнообразие является важным источником новых антибактериальных веществ, подтвердивших свою эффективность в ходе естественного отбора. Так, исследование вторичных метаболитов организмов, принадлежащих к царству грибов, привело к открытию пенициллинов, цефалоспоринов, плевромугилинов и др.

В Отделении Молекулярной и Радиационной Биологии ПИЯФ сформирована коллекция дрожжей и дрожжеподобных грибов, которая насчитывает порядка 2500 штаммов. Микроорганизмы коллекции были обнаружены в результате научно-исследовательских экспедиций в экстремальные труднодоступные регионы России – на Камчатку, Курильские острова, остров Сахалин.

В настоящее время ведется масштабная научно-исследовательская работа по анализу антибактериальной активности микроорганизмов коллекции с помощью высокопроизводительного скрининга и анализу видовой принадлежности штаммов с помощью метода секвенирования. Показаны антимикробные свойства вторичных метаболитов 600 штаммов коллекции, при этом выявлена принадлежность некоторых из них роду *Cryptococcus* (*Naganishia*).

Целью данного исследования было установление генетических взаимосвязей внутри группы неизвестных дрожжевых микроорганизмов с использованием данных секвенирования видоспецифичных последовательностей ДНК. Штаммы указанной группы подобраны таким образом, что их вторичные метаболиты приводят к снижению бактериального роста более чем в 2 раза в течение 24 часов. Морфолого-генетические особенности микроорганизмов различаются.

Анализ данных секвенирования осуществлялся по следующей схеме: установление видовой принадлежности исследуемых штаммов с помощью баз данных грибов; проведение множественного выравнивания полученных последовательностей; построение филогенетического дерева на основании множественного выравнивания; визуализация данных; проверка достоверности полученного филогенетического дерева.

Полученные данные расширяют представление о взаимосвязи различных видов дрожжей с антимикробной активностью, а также позволяют прогнозировать появление антибактериальных свойств у близкородственных одноклеточных грибов.

Работа выполнена при финансовой поддержке «КГЦ – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение № 075-15-2019-1663.



ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ ПРОИЗВОДСТВА БЕЛКА ДИСПЕРСИНА В, РАЗРУШАЮЩЕГО БИОПЛЕНКИ

Юдин Д.А.^{1,2}, Шаталов И.С.², Леонова Л.Е.¹

¹ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия;

²ООО «Иннова Плюс», Санкт-Петербург, Россия

dayudin78@gmail.com

На сегодняшний день науке хорошо известно о том, что в естественной среде микроорганизмы чаще всего существуют не в свободной форме, а образуют биопленки. Биопленки представляют из себя сложные многоклеточные агрегаты, защищающие микроорганизмы от негативных факторов окружающей среды. Структура и состав биопленок позволяют бактериям заселять поверхности самого различного состава (металлы, полимеры, органические субстраты), а также не поддаваться действию антибиотиков и других бактерицидных препаратов. Известно, что бактерии могут образовывать биопленки на медицинских катетерах и имплантах, что может приводить к тяжелым инфекционным и воспалительным заболеваниям (сепсис, парадонтоз, гнойные инфекции). Основным структурным компонентом внеклеточного полисахаридного матрикса у большинства бактерий является PNAG – линейный полимер остатков N-ацетилглюкозамина в бета-(1,6)-связях. PNAG продуцируется грамотрицательным периодонтопатогеном *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, который также способен синтезировать белок дисперсин В – гликозилгидролазу, расщепляющую PNAG.

В исследовании Izano et. al. было показано, что предварительно обработанные дисперсином В биопленки *A. actinomycetemcomitans*, вызывающей острую форму парадонтоза, становились чувствительными к отслаиванию с помощью додецилсульфата натрия. В другом исследовании установили, что использование дисперсина В в сочетании с антибиотиком цефамандолом нафатом (CEF) способно разрушать биопленки *Staphylococcus epidermidis* на полимерных носителях, из которых состоят медицинские катетеры. В то же время Darouiche с коллегами продемонстрировали значительное снижение роста биопленок на медицинских катетерах, предварительно обработанными дисперсином В, такими бактериями как *S. aureus*, *S. epidermidis* и *Escherichia coli*. Подобные исследования мотивировали компании начать разработку и выпуск препаратов, содержащих дисперсин В. Например, в данный момент канадская компания Kane Biotech Inc. разрабатывает и продает препараты с использованием дисперсина В, но на российском рынке аналоги подобных препаратов широко не представлены. Исходя из всех вышеизложенных фактов, можно заключить, что дисперсин В является перспективным антибиопленочным агентом, который может использоваться в медицинской практике для предотвращения колонизации медицинских катетеров и имплантов опасными бактериальными штаммами.

Целью нашей работы является оптимизация методов выделения и очистки рекомбинантного белка дисперсина В, а также дальнейшее изучение его антибиопленочной активности на PNAG-продуцирующих бактериальных штаммах.



БИОТЕХНОЛОГИЯ

СОЗДАНИЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ В КЛЕТКАХ БАКТЕРИЙ

Безгина М.Д., Журавлева Г.А., Бондарев С.А.

ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Bezgina.ma@yandex.ru

Короткие пептиды используют в фармакологической, косметической и пищевой промышленности, а также для создания биоматериалов. В настоящее время существуют такие методы получения коротких пептидов как ферментативный гидролиз, химический синтез и продукция в живых организмах. Недостатком подхода на основе ферментов является то, что так можно получить только пептиды, встречающиеся в существующих белках. Химический синтез характеризуется дороговизной процесса, а также использованием токсичных веществ, которые опасны для окружающей среды и экологии. При продукции пептидов в системе *in vivo* кодирующую последовательность пептида сливают с геном белка, который можно легко выделить из клеток вместе с необходимым пептидом. Между белком и пептидом вводят сайт для последующего протеолиза, что позволяет затем отделить пептид от остального белка. Такой метод получения коротких пептидов имеет потенциал для промышленного использования.

В ходе работы мы создали конструкцию для продукции коротких пептидов в клетках бактерий *Escherichia coli*, слитых с белком МВР (maltose binding protein). За основу была взята плазида для сверхпродукции МВР. К гену этого белка были добавлены последовательности, кодирующие тракт из двенадцати гистидинов, сайт для TEV протеазы, а также сайты для специфического гидролиза XhoI и HindIII. Наличие этих уникальных сайтов позволяет в дальнейшем легко вносить в эту конструкцию кодирующие последовательности пептидов. Фрагменты, кодирующие короткие пептиды, можно получать, достраивая частично комплементарные пары олигонуклеотидов.

Таким образом, полученную нами конструкцию можно использовать как вектор для создания плазмид, продуцирующих короткие пептиды в клетках бактерий *E. coli*.



БИОСОВМЕСТИМЫЕ ГИДРОГЕЛИ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЕКТИНОВ ИМИТИРУЮТ МИКРООКРУЖЕНИЕ НИШИ НЕРВНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

**Белюсов А.С.¹, Кумейко В.В.^{1,2}, Швед Н.А.^{1,2}, Гринченко А.В.², Ланских Д.В.¹,
Малыкин Г.В.², Ковалев В.В.², Кузякова О.Ю.¹, Дюйзен И.В.²**

¹ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, Россия;

²ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского»
ДВО РАН, Владивосток, Россия

andrei-belousov@mail.ru

Среди всех опухолей головного мозга мультиформная глиобластома является наиболее распространенной среди взрослых, а также наиболее агрессивной. Стандартное лечение глиобластомы фокусируется только на опухолевых клетках, игнорируя их внеклеточный матрикс (ВКМ). Однако было доказано, что ключевую роль в развитии и прогрессировании опухоли играют не сами опухолевые клетки, а внеклеточный матрикс и ниша опухолевых стволовых клеток, которую он образует.

Использование материалов, которые имитируют нормальный ВКМ и создают микроокружение для клеток в резекционной полости после удаления опухоли головного мозга, может значительно улучшить прогноз. Требуемый матриксный материал должен максимально имитировать биомеханические свойства нативной ткани.

Перспективным применением гидрогелей является использование их в качестве имплантируемого матриксного материала в регенеративной медицине и трансплантологии для ремоделирования структуры ткани, доставки клеток или лекарств в мозг.

Углеводные полимеры играют очень важную роль в ВКМ нервной ткани, формируя уникальное микроокружение, препятствующее активной пролиферации и миграции нервных клеток взрослой нервной системы.

Нами разработан набор гидрогелей на основе пектинов с различным содержанием свободных карбоксильных групп. Все гидрогели биосовместимы и при подкожной имплантации не вызывают значимого иммунного ответа. Скорость биodeградации зависит от степени этерификации пектина. Модули упругости гидрогелей находятся в диапазоне от 100 до 1100 Па в зависимости от степени этерификации, что соответствует вязкоупругим свойствам нормального мозга млекопитающих. Все гидрогели, используемые в качестве матриц для культивирования клеток, поддерживают высокую жизнеспособность нервных стволовых клеток (НСК), клеток глиомы С6 и нейробластомы N2a, снижают скорость пролиферации, защищают НСК от дифференцировки и сохраняют нейросферы, морфология которых зависят от степени этерификации пектина. Молекулярные механизмы воздействия биоматериала на клетки, включают подавление сигнального пути MAPK/ERK. Транскриптомный анализ выявил изменения в путях регуляции клеточного цикла, поддерживающие высокие уровни экспрессии нескольких компонентов, необходимых для поддержания стволовости, включая циклин D, в то время как обнаруженная высокая экспрессия Gadd45 может быть ответственна за замедление пролиферации НСК, культивируемых на пектиновых гидрогелях.

Работа выполнена при поддержке проекта Государственного задания Минобрнауки России № 0657-2020-0004.



ВЛИЯНИЕ НОКДАУНА ГЕНА СКВАЛЕН-СИНТАЗЫ НА МЕТАБОЛИЗМ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ФАРНЕЗИЛ-ДИФОСФАТА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ХРИЗАНТЕМЫ

Деев Р.А., Фирсов А.П., Пушин А.С., Кочетов А.П., Долгов С.В.

Филиал ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Пушино, Россия

deevrome@icloud.com

В настоящее время актуальным направлением прикладной молекулярной биологии растений является метаболическая инженерия, позволяющая получать в растительных системах низкомолекулярные вещества небелковой природы, в норме у них отсутствующие. К числу таких метаболитов относится артемизинин – терпеновый лактон из полыни однолетней (*Artemisia annua*), являющийся наиболее эффективным препаратом для лечения малярии. В качестве гетерологичного растения-продуцента нами была выбрана родственная полыни хризантема садовая (*Chrysanthemum morifolium*), обладающая высоким содержанием терпеноидов и их предшественников.

Ранее в лаборатории была успешно получена трансгенная линия хризантемы 1240-1, трансформированная генами биосинтеза артемизинина. Для повышения накопления целевого вещества, а также более глубокого изучения метаболизма терпеноидов, мы обратили внимание на роль фарнезил-дифосфата (FDP). Он является предшественником ряда соединений, к которым помимо артемизинина относятся фарнезены, кариофиллены, гермакрены и сквален. Дефицит FDP может быть одним из лимитирующих факторов накопления артемизинина. Нокдаун гена сквален-синтазы в линии хризантемы 1240-1 теоретически должен вызвать повышение уровня свободного FDP и увеличение его вовлеченности в другие терпеноидные пути, в том числе и в артемизининовый.

Нами была впервые клонирована кДНК гена сквален-синтазы хризантемы, на основе которой был сконструирован вектор с РНК-интерференционной конструкцией для нокдауна этого гена (pCamSQ). Методом агробактериальной трансформации был получен двойной трансформант – линия 1240SQ1, которая была использована в дальнейшем анализе методами qRT-PCR и GC-MS. По сравнению с исходной линией 1240-1 уровень транскрипции сквален-синтазы в 1240SQ1 снизился в два раза, что также вызвало пропорциональное снижение накопления сквалена. Накопление же артемизинина не увеличилось. Одновременно произошло увеличение транскрипции гена β -фарнезен синтазы и накопления β -фарнезена в 7 и 60 раз, соответственно.

Из полученных данных следует, что нокдаун гена сквален-синтазы привел к резкой активации синтеза β -фарнезена. Мы предполагаем, что в условиях нокдауна образовалось депо свободного FDP, который был направлен на синтез конкурирующего за него терпеноида. Однако этим терпеноидом стал β -фарнезен, а не артемизинин. Таким образом, мы подтвердили применимость данной стратегии для модификации метаболизма растений. При этом необходимо учитывать пока непредсказуемый характер подобных изменений в связи с большим количеством не известных нам факторов экзогенной и эндогенной природы.



ВЛИЯНИЕ ГИДРАВЛИЧЕСКОГО ВРЕМЕНИ УДЕРЖАНИЯ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ В АНАЭРОБНОМ РЕАКТОРЕ НА ВЫХОД БИОВОДОРОДА

Дорожкина Д.Ю.¹, Михеева Э.Р.², Катраева И.В.³

¹ФГБОУ ВО Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексева,
Нижний Новгород, Россия;

²ФГАОУ ВО Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия;

³ФГБОУ ВО Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет,
Нижний Новгород, Россия

biomikheeva@gmail.com

Использование анаэробного сбраживания (АС) для переработки органических отходов неуклонно растет. Шагом вперед в распространенном биотехнологическом процессе анаэробного сбраживания биоотходов становится двухэтапный подход к получению водорода в первой стадии АС и метана во второй стадии АС. Производство водорода из богатых углеводами субстратов (таких как промышленные и бытовые органические отходы) с помощью процессов ферментации, называемых в иностранной литературе dark fermentation (DF), является одной из самых многообещающих технологий для получения водорода с высоким выходом. Целью данной работы стало изучение влияния гидравлического времени удержания молочной сыворотки в анаэробном реакторе на выход биоводорода. Исследования проводили в непрерывно работающем анаэробном реакторе из полипропилена объемом 0,9 л. В качестве загрузочного материала были использованы кусочки полиуретановой пены. Кислотогенный реактор (КР) работал в термофильных условиях (57 ± 1)°C при гидравлическом времени удерживания (ГВУ) от 10 до 4 часов и при органической скорости загрузки (ОСЗ) от 13,7 до 33,7 гХПК/(л*сут). Продолжительность непрерывной работы реактора составила 65 дней. Анализ состава биогаза проводили газохроматографическим методом, объем образующегося биогаза измеряли с помощью газовых счетчиков (Ritter, Германия). Наибольший объемный выход биоводорода (1763,2 мл/(л*сут)) и удельный выход биоводорода (76,9 мл/г ХПК) зафиксированы при ГВУ 8 ч и ОСЗ 17,2 кгХПК/(м³*сут). Наибольшая скорость образования биоводорода составила $1,76 \pm 1,59$ л/(л*сут.), а наибольшее значение удельного выхода биоводорода составило 76,9 мл/г ХПК при ГВУ 8 ч. При ГВУ 10 ч в составе биогаза выделялось 42-47% водорода, при 8 ч – 35-43%, при 6 ч – 32-39%, при 4 ч – 19%. Однако скорость образования биоводорода при ГВУ 10 ч была ниже, чем при ГВУ 8 ч. Следовательно, для темного анаэробного сбраживания молочной сыворотки наибольший выход биоводорода был получен при ГВУ 8 ч и ОСЗ 17,2 гХПК/(л*сут). Это исследование позволило выбрать оптимальный режим работы анаэробного реактора при термофильных условиях непрерывного темного сбраживания молочной сыворотки с получение наибольшего выхода водорода.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-79-10153, <https://rscf.ru/project/21-79-10153>.



ВЛИЯНИЕ ПРЯМОЙ ОПТИЧЕСКОЙ ДОЗОЗАВИСИМОЙ ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА НА ИЗМЕНЕНИЕ СОСУДИСТОГО РУСЛА

Ератова Л.В.^{1,2}, Волков М.В.³, Новикова И.Н.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия;

²НТЦ биомедицинской фотоники, Орел, Россия;

³ФГАОУ ВО Национальный исследовательский университет ИТМО,
Санкт-Петербург, Россия

eratovalyuv@gmail.com

Активные формы кислорода (АФК) составляют самостоятельную систему в организме, играющую роль как в ряде физиологических функций, так и во многих патологических процессах. Одной из АФК является синглетный кислород (СК). Сама реактивная способность СК может быть разрушительной для органических молекул, но при её контроле она также является потенциальным методом лечения рака при реализации фотодинамической терапии (ФДТ).

Во время ФДТ СК образуется в результате реакций фотосенсибилизации, в которых соответствующий фотосенсибилизатор (ФС) возбуждается, а затем передает энергию электронного возбуждения кислороду среды. Генерируемый СК способен вызывать деструкцию опухоли посредством отключения её микрокровотока. Однако побочные эффекты от используемых ФС заставляют рассмотреть новые возможности получения данной формы кислорода без применения токсичных препаратов. Появившаяся возможность возбуждения СК лазерным излучением напрямую позволила актуализировать проблему изучения его решающей роли в регуляции сосудистого русла.

Для изучения изменения параметров сосудистого русла под действием СК, не опосредованного влиянием ФС, использовались методы видеокапилляроскопии и лазерной спекл-контрастной визуализации. Прямая оптическая генерация СК осуществлялась на длине волны 1267 нм при дозах 50, 75 и 100 Дж/см², исключающих влияние нагрева на микроциркуляцию. В качестве объекта исследования выбраны крысы линии Wistar (N=3) в возрасте старше 1 месяца весом 200-300 г. Запись эксперимента проводилась непрерывно и включала три этапа: до воздействия в течение 1 минуты, во время облучения с учётом выбранной дозы, после – в течение 30 минут.

Установлена разнонаправленность реакции со стороны сосудистого русла на генерируемый синглетный кислород при различных дозах лазерного воздействия на длине волны 1267 нм. Наблюдалось усиление кровотока или, напротив, его ослабление в момент воздействия лазера. Данный ответ со стороны сосудистого русла сохранялся в течение 15-20 минут после окончания воздействия и частично восстанавливался до исходного состояния к окончанию эксперимента. В дальнейшем планируется расширить выборку посредством увеличения количества объектов исследования и выбранных доз воздействия.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-75-00086 и гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-398.2021.4.



БЕЛОК-ПЕРЕНОСЧИК ХОЛЕСТЕРИНА ЧЕЛОВЕКА STARD1 СПОСОБЕН ПРОЯВЛЯТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Замалутдинова С.В.¹, Исаева Л.В.², Рубцов М.А.¹, Новикова Л.А.²

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

²НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

zamalutdinova.sofya@mail.ru

Биотехнологический синтез стероидных соединений имеет ряд преимуществ перед химическим способом. В связи с этим растет интерес к созданию рекомбинантных микроорганизмов, способных к эффективной биотрансформации стероидов. Показано, что энзиматическая система цитохрома P450_{scc} млекопитающих, осуществляющая трансформацию холестерина в прегненолон (предшественник стероидных гормонов), проявляет функциональную активность в клетках микроорганизмов. Однако уровень содержания образующегося прегненолона недостаточен для их использования в биотехнологической промышленности. Лимитирующей стадией является транспорт холестерина к месту локализации P450_{scc}-системы в клетке микроорганизма. Для решения данной проблемы использованы разные подходы – применение детергентов, пермеабиллизаторов, синтез эндогенного субстрата и поиск наиболее подходящих микроорганизмов. Однако это не привело к созданию высокоэффективных биотехнологических процессов синтеза прегненолона.

В данной работе тестирована возможность использования белка-переносчика холестерина человека STARD1 для повышения эффективности транспорта стероидных субстратов в клетку бактерий. Получены плазмиды pET22/STARD1 и pET22/STARD1-GFP, несущие кДНК, кодирующие функциональный домен белка STARD1(53-285 а.к.) или слитой белок STARD1-GFP с N-концевой последовательностью pelB, адресующей белки в периплазму. При анализе рекомбинантных клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных pET22/STARD1-GFP, методом флуориметрии наблюдается ожидаемый для репортерного белка GFP пик испускания (509 нм), что указывает на правильную конформацию STARD1-GFP в клетках. Western Blot анализ показал, что синтезирующийся в клетках STARD1-GFP в основном стабилен, обнаружено лишь незначительное количество меньшего по размеру иммуноспецифичного белка. STARD1 способен увеличивать содержание внутриклеточного холестерина (показано с использованием ВЭЖХ-МС) и его флуоресцентного аналога 22-NBD-гидроксихолестерина (показано с использованием флуоресцентной спектроскопии) в клетках бактерий *E. coli*/pET22/STARD1 в 1,5 и 2 раза соответственно в сравнении с контрольным штаммом. Таким образом, впервые показано, что переносчик холестерина STARD1 способен проявлять функциональную активность в гетерологичных клетках. Полученные данные указывают на то, что использование белков-переносчиков для более эффективной доставки в клетки холестерина и повышения уровня его трансформации реконструированной в клетках P450_{scc}-системой является перспективным.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-08-00467А.



ВЛИЯНИЕ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS VESICULOSUS* НА ПРОДУКТИВНОСТЬ КУР-НЕСУШЕК

Зимин Е.Е., Кочиш И.И., Никонов И.Н.

ФГБОУ ВО Московская государственная академия ветеринарной медицины и
биотехнологии им. К.И. Скрябина, Москва, Россия

eug2.zimin@gmail.com

Бурые водоросли рода *Fucus* являются источником микроэлементов йода и брома в биодоступной форме, а также источником фукоидана – полисахарида, стимулирующего рост численности бифидобактерий в кишечнике. Фукусовые водоросли можно использовать в качестве пребиотика и антистрессового препарата в кормлении сельскохозяйственной птицы. Целью исследования являлась оценка действия фукусовой крупки (фракция 0,2-0,8 мм) в кормлении кур-несушек.

Опыт по кормлению проводили на птице яичного направления продуктивности (промышленный кросс «Хайсекс коричневый»), в возрасте 29-32 недель. Интенсивность яйцекладки контрольной и опытных групп на начало опыта была одинаковой и составляла 93,35%. Фукусовая крупка была получена из высушенных бурых водорослей, собранных на побережье Белого моря, в Беломорском районе республики Карелия в августе 2020 года. Крупку фукусовых водорослей вводили в рацион в концентрациях 0,5%, 1,0%, 1,5%. Для оценки влияния фукусовых водорослей использовали биохимические, зоотехнические и молекулярно-генетические методы исследований. Оценивали влияние кормовой добавки из водорослей на показатели морфологии и массы яйца.

При использовании кормов, содержащих крупку фукусовых водорослей, не было выявлено достоверных различий по показателю живой массы между контрольной и опытными группами. Необходимо отметить, что показатель продуктивности у несушек, получавших дополнительно водоросли в количестве 0,5% и 1,0%, был на уровне контрольной группы. Интенсивность яйцекладки у опытной группы, получавшей 1,5% фукусовой крупки, была достоверно ниже контрольного показателя на 1,2%. Тем не менее, масса яйца у опытных групп была достоверно выше показателя контрольной группы на 3,49-3,61-4,37%. Были выявлены и различия в морфологии яйца, подтверждающие положительное влияние добавки из фукусовых водорослей.

Таким образом, по результатам исследований, было установлено, что ввод больших концентраций крупки из бурых водорослей рода *Fucus* существенно не влияет на показатели продуктивности у промышленных несушек. Выявлено положительное действие фукусовой крупки на показатели массы и морфологии яиц.



ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ БАКТЕРИЙ- ДЕСТРУКТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ И ИЛОВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Иминова Л.Р.

ФГБОУ ВО Пушчинский государственный естественно-научный институт, Пушчино, Россия

uzdleila90@gmail.com

По состоянию на 2020 года на территории страны функционируют 74 нефтеперерабатывающих завода, и суммарная мощность первичной обработки нефти превышает 330 млн тонн в год. Масштабы потребления фенолов в мире приближаются к 2 млн тонн в год. Широкомасштабное производство и использование фенолов неизбежно приводит к их попаданию в окружающую среду, что вследствие высокой токсичности данных соединений наносит огромный вред экологии. Это обуславливает необходимость разработки технологий их обезвреживания. Одним из путей решения этих проблем является использование биопрепаратов на основе высокоэффективных бактерий- деструкторов.

Методом накопительного культивирования из образцов донных и иловых отложений сточных вод были выделены бактерии, способные к деструкции фенола и нефтепродуктов. Штаммы отбирали по способности к использованию углеводов и фенола в качестве единственного источника углерода. Всего отобрано порядка 25 штаммов. В дальнейшем эти штаммы исследовали на способность утилизировать фенол в качестве единственного источника углерода при его содержании в среде от 0,2 до 2,5 г/л, а также на способность к деградации нефтепродуктов (сырая нефть – 2%, солярка и бензин – 1%). В ходе исследования было определено, что 5 штаммов способны к утилизации фенола в концентрации 2 г/л, 3 штамма – в концентрации 2,5 г/л, что позволяет отнести эти штаммы к высокоэффективным бактериальным деструкторам фенола. Помимо фенола, исследуемые штаммы способны к трансформации сырой нефти (НПЗ «Москва – Капотня») и её компонентов. Процент убыли нефтепродуктов в образцах, обработанных исследуемыми штаммами составил от 40 до 50% за 15 суток, а убыль фенола составила от 70,4 до 94% за 3 суток.

Таким образом, проведённое исследование позволило не только выделить бактерии – деструкторы токсичных соединений, но и показало перспективу их использования для создания высокоэффективных биопрепаратов для очистки объектов окружающей среды от токсичных загрязнителей.

Исследования поддержаны грантом РФФИ 19-54-80003.



ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ДРОЖЖЕЙ
KOMAGATAELLA KURTZMANII, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ
К УТИЛИЗАЦИИ СОРБИТОЛА

Калабанова Д.Д.^{1,2}, Акентьев Ф.И.^{1,3}, Губайдуллин И.И.^{1,3}, Козлов Д.Г.³

¹ФГБУ НИЦ Курчатовский институт, Курчатовский геномный центр, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Россия;

³ФГБУ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

kalabanova_dasha@mail.ru

В настоящее время штамм метилотрофных дрожжей *Komagataella kurtzmanii* ВКПМ Y-727 используется в качестве основы новой эффективной системы экспрессии генов, превосходящей известный прототип на базе *Komagataella phaffii* GS115 (бывш. *Pichia pastoris*) [1-2]. Одним из препятствий для развития системы является природный дефект в утилизации сорбитола [1], который используется в качестве субстрата для эффективного биосинтеза белков при индукции метанолом в клетках дрожжей *K. phaffii*.

Целью настоящей работы было изучение генетических особенностей и получение производных штамма *K. kurtzmanii* Y-727, способных к утилизации сорбитола.

Было проведено полногеномное секвенирование дрожжей *K. kurtzmanii*, и выполнен сравнительный биоинформатический анализ геномов *K. kurtzmanii* и *K. phaffii*. В результате для исследования были выбраны 5 генов-кандидатов, потенциально причастных к метаболизму сорбитола. В их числе ген сорбитолдегидрогеназы *SDH* и 4 гена, кодирующих трансмембранные белки, переносчики углеводов. ПЦР-копии выбранных генов из генома *K. phaffii* были использованы для трансформации и комплементации аналогичных генов в клетках *K. kurtzmanii*.

Эффективность утилизации сорбитола клетками полученных трансформантов оценивали в ростовых тестах на синтетических средах с сорбитолом, который применяли в качестве единственного источника углерода. Результаты тестов показали, что введение в клетки *K. kurtzmanii* гена сорбитолдегидрогеназы *SDH K.phaffii* вызывало полную комплементацию дефектного признака. При этом скорость роста полученных трансформантов превышала аналогичный показатель контрольного штамма *K.phaffii*, не имевшего ростового дефекта. Остальные 4 гена-кандидата, кодировавшие потенциальные белки-транспортёры, значимых эффектов не проявили.

Таким образом, было установлено, что дефект в утилизации сорбитола дрожжами *K. kurtzmanii* являлся моногенным признаком и полностью комплементировался гетерологичным геном сорбитолдегидрогеназы *SDH K.phaffii*.

Литература.

1. Naumov, G.I., Naumova, E.S., Tyurin, O.V. et al. *Komagataella kurtzmanii* sp. nov., a new sibling species of *Komagataella (Pichia) pastoris* based on multigene sequence analysis. *Antonie van Leeuwenhoek* 104, 339–347 (2013). <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9956-7>.
2. Matveeva, A.Yu., Gubaidullin, I.I., Fedorov, A.S. et al. Optimization of the Expression of 1,3-1,4-β-glucanase Gene from *Rhizomucor miehei* in the *Komagataella kurtzmanii* yeast. *Biotekhnologiya* 35(5), 3-11 (2019). <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-5-3-11>.



ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЮЧЕВОГО АМИНОКИСЛОТНОГО ОСТАТКА,
ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ EGH12 ИЗ
ТЕРМОФИЛЬНОГО ГРИБА *THIELAVIA TERRESTRIS*

Калашников М.В.¹, Майорова К.А.¹, Селимзянова А.И.², Рыков С.В.³, Березина О.В.³

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств,
Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Пушкинский Государственный Естественно-Научный Институт,
Пушино, Россия;

³ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс генетических исследований
(ГосНИИгенетика), Москва, Россия

maxim07092001@gmail.com

Важнейшей задачей для сельского хозяйства РФ является разработка импортозамещающих технологий получения кормовых добавок, ориентированных на использование отечественных ферментных препаратов. Корма для сельскохозяйственных животных состоят в основном из злаковых культур, в состав которых в большом количестве входят некрахмалистые полисахариды (НКП). Ферментативная деполимеризация НКП снижает их вязкость, что способствует улучшению качества и повышению питательной ценности кормов. Подготовку кормов часто проводят при повышенной температуре, поэтому возникает необходимость использования термостабильных ферментов.

Грибы являются природными деструкторами растительной биомассы и синтезируют многочисленные гликозил-гидролазы – ферменты, которые широко применяются в качестве кормовых добавок. Термостабильная эндоглюканаза Egh12 из термофильного мицелиального гриба *Thielavia terrestris* гидролизует внутренние бета-(1,3)- и (1,4)-гликозидные связи в растворимых разветвленных и неразветвленных бета-глюканах (ксилоглюкане, лихенане, бета-глюканах злаков). Фермент максимально активен на бета-глюкане ячменя при 70°C; время полуинактивации при 65 °C составляет 138 мин.

Целью работы стала идентификация аминокислотных остатков, ответственных за термостабильность эндоглюканазы Egh12, относящейся к семейству 12 гликозил-гидролаз (GH12). Структурно-функциональные исследования выявили аминокислотные остатки, влияющие на термостабильность ряда ферментов семейства GH12. На основе анализа этих данных, а также гомологичного моделирования пространственной структуры ферментов GH12, было сделано предположение, что остаток V43 играет ключевую роль в сохранении стабильности структуры Egh12 при высоких температурах. Для проверки гипотезы был сконструирован мутант фермента с заменой V43S. Для этого был проведен сайт-специфический мутагенез кодирующей части гена *egh12* без интронов и лидерного пептида. Дикий и мутантный варианты гена *egh12* клонировали в вектор pET28a_6xHIS_TeV и экспрессировали в *E. coli*. Затем оба варианта белка выделили и очистили с помощью аффинной хроматографии. Термостабильность ферментов исследовали при температуре 45-75°C в широком временном диапазоне. Показано, что при 60°C Egh12_V43S инактивируется, тогда как время полуинактивации Egh12 составляет 200 мин, что подтверждает ключевую роль V43 в поддержании термостабильности.

Экспериментальная идентификация аминокислот, ответственных за поддержание термостабильности гликозил-гидролаз семейства 12, необходима для улучшения свойств ферментов этого семейства методами белковой инженерии.



ПОЛУЧЕНИЕ НАНОМАТЕРИАЛА ИЗ ВЫСОКООРИЕНТИРОВАННЫХ СВОБОДНОПОЗИЦИОНИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ВОЛОКОН

Канев И.Л., Антонова О.Ю., Кочеткова О.Ю., Шляпникова Е.А., Шляпников Ю.М.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

4kanev@gmail.com

Материалы из ориентированных волокон с диаметром менее одного микрона, позволяющие осуществлять ускоренный и направленный рост клеток, представляют особый интерес для современной тканевой инженерии. Нами разработан способ получения наноструктурированного материала из высокоориентированных свободно позиционируемых полимерных нановолокон, свободный от ограничений, связанных с накоплением электрического заряда на волокне, наблюдаемом при классическом электропрядении. При длительном электропрядении на образуемых волокнах накапливается электрический заряд той же полярности, что и распыляемый раствор полимера. Этот заряд отталкивает следующие осаждаемые заряженные волокна, что приводит к нарушению ориентации нановолокон и к снижению эффективности электропрядения (увеличивается время изготовления наномата и уменьшается его плотность). Для решения технической проблемы накопления заряда предложено ввести в процесс получения наноматов на вращающемся заземленном проволочном коллекторе дополнительную стадию. Для нейтрализации остаточного электрического заряда процесс электрораспыления периодически приостанавливается, и наномат, непосредственно находящийся на коллекторе, обрабатывается воздушными аэроионами противоположного знака. Аэроионы генерируются с помощью коронного разряда с острия металлического электрода, соединенного с источником высокого напряжения с полярностью, противоположной приложенной к капилляру с раствором полимера. Данная технология позволяет одновременно изготавливать партии из нескольких десятков наноматов из широкого спектра полимеров, в том числе биосовместимых и биodeградируемых, с контролируемыми значениями размера волокон и плотности получаемого материала.

В испытаниях *in vitro* показано, что подложки из нейлоновых волокон со средним диаметром 60 нм и 300 нм инициируют направленный рост нейритов, а также усиливают синаптогенез и образование связей между нейронами гиппокампа.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-74-10097.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ CRISPR/CAS9 ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА *IRBIT*

Копылова Е.Е., Кабанова Н.Б., Рогачевская О.А., Ковалицкая Ю.Е.

ФИЦ ПНЦБИ ИБК РАН, Пушкино, Россия

ikopylov76@gmail.com

IRBIT – регуляторный белок, конкурирующий с IP3-рецептором за связывание IP3. Аффинность *IRBIT* к IP3R1 регулируется за счет его фосфорилирования Ca²⁺-зависимыми киназами. Для получения рекомбинантных клеточных линий с инактивированным геном, кодирующим *IRBIT*, мы использовали модифицированную систему CRISPR/Cas9-10A. Система CRISPR/Cas9 является методом направленного нанесения разрыва ДНК,



приводящего к клеточного активации ответа на повреждение ДНК, который может вызывать либо негомологичное концевое соединение (NHEJ), либо репарацию ДНК по механизму гомологической рекомбинации (HDR). Для редактирования гена IRBIT мы разработали систему для репарации двуцепочечного разрыва ДНК по механизму гомологической рекомбинации с использованием донорной генетической матрицы, которая позволила точно редактировать одиночные нуклеотиды в локусе гена IRBIT. Сконструированная экспрессионная кассета на основе вектора AIO-GFP обеспечивала экспрессию никазы Cas9-D10A, слитой с EGFP, и двух РНК-гидов, содержащих смысловой или антисмысловый спейсеры. Однонитевые разрывы, наносимые Cas9-D10A на близко лежащих участках ДНК, должны привести к появлению одиночного двунитевого разрыва с длинными выступающими концами в целевом участке IRBIT. Донорная матрица для репарации ДНК разрыва была сконструирована таким образом, чтобы в ней была одна нуклеотидная замена в области протоспейсера, с помощью которой вводится искусственный сайт рестрикции XhoI, а также точечная делеция одного нуклеотида для исчезновения антисмыслового сайта PAM, узнаваемого никазой Cas9-10A, и две руки гомологии размерами 358 п.о. и 287 п.о. Синтез двуцепочечной dsDNA матрицы, содержащей требуемые мутации, был проведен с применением мегапраймеров и ПЦП на геномной ДНК по механизму «overlap extension». Длинная одноцепочечная ssDNA -матрица была получена в реакции гидролиза антисмысловой нити dsDNA ферментом Strandase (Такара). Сконструированной экспрессионной кассетой и одноцепочечной ssDNA-матрицей были трансфицированы клетки HEK293, затем селектированы по зеленой флуоресценции и индивидуально рассажены для культивирования. Амплифицированный участок геномной ДНК (645 п.н.), выбранный для редактирования системой CRISPR/Cas9-10A, подвергся рестрикции по сайту XhoI для выявления в трансфицированных клетках направленной репарации по механизму HDR. В результате разработана система для репарации разрыва ДНК в локусе гена IRBIT по механизму HDR с введением маркера, позволяющего отличить отредактированную ДНК от ДНК дикого типа, и созданы рекомбинантные клеточные моноклоны HEK293 с отредактированным геном IRBIT.

ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НАНОЧАСТИЦ CeO₂GdO₃ после воздействия протонов водорода и рентгеновского излучения *IN VITRO*

Колманович Д.Д.¹, Попов А.Л.¹, Замятина Е.А.¹, Аникина В.А.¹, Иванов В.К.²

¹ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия;

²ФГБУН Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

kdd100996@mail.ru

Второй из основных причин смертности в мире до сих пор остается онкология. Из существующего арсенала лечения опухолевых новообразований лучевая терапия используется в 70% случаев. Одними из перспективных радиотерапевтических методов повышения эффективности облучения являются использование радиосенсибилизаторов, за счет снижения лучевой нагрузки на здоровые клетки, и/или использование заряженных частиц в качестве источника облучения, за счет прецизионности действия. Использование оксидов редкоземельных металлов, например гадолиния может значительно снизить лучевую нагрузку на здоровые ткани и клетки, что позволяет рассматривать их в качестве радиосенсибилизаторов.



В рамках данной работы гидротермально-волновым способом нами были синтезированы наночастицы оксида церия, допированные гадолинием и тербием (размер 20-30 нм) и исследована их радиосенсибилизирующие свойства *in vitro*. Клоногенный анализ и флуоресцентная микроскопия с использованием флуоресцентных красителей, детектирующих ядра мертвых клеток (йодид пропидия) и Yo/Pro-1, окрашивающий только апоптотические клетки нами были использованы для оценки цитотоксичности. Исследования проводились на культуре клеток остеосаркомы человека линии MNNG/HOS, которые после 10-часовой инкубации с наночастицами облучали рентгеновским излучением или пучком протонов в дозах 1,5, 3 и 5 Гр. Оценка уровня апоптоза и жизнеспособности клеток проводили через 72 часов после воздействия, а оценку клоногенной активности через 144 часа инкубации.

Результаты данного исследования показали достоверно значимое снижение жизнеспособности клеток после облучения в присутствии наночастиц $\text{Ce}_{0,2}\text{Gd}_{0,7}\text{O}_2:\text{Tb}_{0,1}$. При воздействии протонами было продемонстрировано резкое увеличение доли мертвых клеток (более 50%) при концентрации наночастиц 4 мкг/мл уже при дозе облучения 1,5 Гр, в то же время эта же концентрация наночастиц при облучении рентгеновским излучением продемонстрировало увеличение доли мертвых клеток до 10% при облучении в дозе 5 Гр. При облучении протонами в дозе 5 Гр клеток, культивируемых с наночастицами в концентрации 0,2 мМ было продемонстрировано увеличение количества апоптотических клеток более чем в два раза по сравнению с контрольными группами, в то же время при той же дозе облучения рентгеновским излучением при концентрации наночастиц 0,2 мМ было продемонстрировано увеличение доли апоптотических клеток в 1,42 раза по сравнению с контрольными группами.

Исследование клоногенной активности после облучения рентгеновским излучением не показало значимого вклада в общий токсический эффект. Однако, при облучении пучком протонов после культивирования с наночастицами показали яркий радиосенсибилизирующий эффект, а именно снижение клоногенной активности в 6,3 раза при дозе 5 Гр и концентрации наночастиц 0,2 мМ по сравнению с контрольными группами.

Был показан наиболее яркий радиосенсибилизирующий эффект наночастиц $\text{Ce}_{0,2}\text{Gd}_{0,7}\text{O}_2:\text{Tb}_{0,1}$ при облучении пучком протонов, нежели рентгеновскими лучами с идентичным дозах.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-74-00086.

ГЕТЕРОЛОГИЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ ПЕПТИДЫ УВЕЛИЧИВАЮТ УРОВЕНЬ БИОСИНТЕЗА БЕТА-ЦЕПИ ТИРЕОТРОПНОГО ГОРМОНА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ СНО

Кочина Я.А., Синегубова М.В., Орлова Н.А., Воробьев И.И.

ФГУ ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии, Москва, Россия

Yaroslava.Kochina@student.msu.ru

Тиреотропный гормон человека (ТТГч) – гетеродимерный белок, состоящий из альфа- и бета-цепей. Альфа-цепь является общей для семейства гонадотропных гормонов, а бета-цепи, в свою очередь, для каждого гормона индивидуальны. Рекомбинантный ТТГч, получаемый при помощи клеток яичника китайского хомячка СНО, используется для диагностики и лечения рака щитовидной железы.



При создании продуцентов гетеродимерных белков в клетках CHO один из пары генов обычно экспрессируется сильнее, чем другой, что может приводить к падению уровня секреции гетеродимера, а также накоплению некорректных вариантов целевого белка и мультимеров. Ранее в нашей лаборатории было установлено, что при экспрессии генов альфа- и бета-цепей ТТГч с их нативными сигнальными пептидами в культуральной среде обнаруживается смесь гетеродимерного ТТГч и свободной альфа-цепи. Мы предположили, что недостаточный уровень биосинтеза бета-цепи может быть вызван низкой эффективностью процессинга ее нативного сигнального пептида.

Для проверки этой гипотезы мы создали генетические конструкции на основе ранее разработанной нами векторной плазмиды p1.1 с промотором EF-1a китайского хомячка и дополнительно содержащей EMCV IRES дикого типа, разделяющий два цистрона целевых генов. Было получено четыре конструкции, в которых области ОРС зрелого полипептида бета-цепи ТТГч предшествовали сигнальные пептиды: азуроцидин (Az), человеческий альбумин (HSA), сигнальный пептид альфа-цепи ТТГч (alpha) и контрольный нативный сигнальный пептид бета-цепи ТТГч.

Для достижения поставленной цели мы трансфицировали генетические конструкции с сигнальными пептидами (Az, HSA, alpha, beta) в клетки CHO с инактивированными аллелями гена dhfr, получали стабильные линии, используя 200 нМ ингибитора DHFR метотрексата и проводили геномную амплификацию конструкций под давлением 2 мкМ.

Было установлено, что для всех трех гетерологичных сигнальных пептидов уровень секреции гетеродимера ТТГч в 1,5-5 раз выше, чем для нативного, при этом отношение свободной альфа-цепи к гетеродимеру ТТГч в культуральной среде падает в 800-8000 раз, таким образом, увеличение титра ТТГч во всех случаях может быть объяснено увеличением уровня биосинтеза бета-цепи ТТГч. Самый высокий титр наблюдается с HSA-сигнальным пептидом и достигает более 56 мг/л по данным ИФА.

Использование гетерологичных сигнальных пептидов обильно секретируемых белков вместо нативных сигнальных пептидов бета-цепей гонадотропных гормонов может существенно увеличить удельную продуктивность промышленных продуцентов белков данного типа и улучшить экономические параметры их производства.

ОПТИМИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КОМПЛЕКСА ДЛЯ ГИДРОЛИЗА ЯБЛОЧНЫХ ВЫЖИМОК И СВЕКЛОВИЧНОГО ЖОМА

Курьшкина М.С.¹, Семёнова М.В.²

¹ФГБОУ ВО Московский Государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

²ФГУ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

mariia.kuryshkina@chemistry.msu.ru

Отходы растительного происхождения можно рассматривать как потенциально ценный источник биотехнологических продуктов. Яблочные выжимки (ЯВ) и свекловичный жом (СЖ) на данный момент широко используются в кормопроизводстве. Однако эти пектин-обогащенные субстраты можно использовать в других целях: получения пектина, производства продуктов с высокой добавленной стоимостью – сахаров и биоэтанола.



Эффективную биоконверсию сложных полисахаридных субстратов можно осуществить гидролизом в присутствии оптимального по составу ферментативного комплекса.

Целью работы было выявление ключевых ферментов, участвующих в гидролизе ЯВ и СЖ и подбор оптимального ферментативного комплекса для эффективной конверсии субстратов.

Для глубокого гидролиза (40°C, pH 5,0, 48 ч) ЯВ и СЖ были использованы следующие очищенные ферменты: целлюлазный комплекс (Ц) был представлен целлюбиогидролазой 1, эндоглюканазой 2 *Penicillium verruculosum* и β -глюкозидазой *Aspergillus niger*, пектиновый комплекс – пектинлиазой (ПЛ) *P. canescens*, гемицеллюлазный – эндогалактаназой (ЭГ) и эндоарабиназой (ЭА) *A. niger*, арабинофуранозидазой (АФ) *A. foetidus*, арабиноксилан-арабинофурангидролазой (АКГ) и β -галактозидазой (β Г) *P. canescens*.

При гидролизе ЯВ гемицеллюлазами, наиболее эффективной была смесь ЭА+АФ, степень конверсии субстрата Ω составила 84%, коэффициент синергизма $k = 1,55$. Варьируя соотношение ферментов целлюлазы – пектиназы – гемицеллюлазы, было установлено, что наиболее эффективной оказалась смесь 0,7Ц+0,1ПЛ+0,2(ЭА+АФ) (в соотношении по белку), Ω составила 94%, $k = 1,65$. Из 100 г сухого субстрата ЯВ было получено 2.5 г арабинозы, 66.0 г фруктозы и 34.9 г глюкозы.

При гидролизе СЖ смесями ЭГ+ β Г, ЭА+АФ или ЭА+АКГ Ω составила 5, 8 или 9% соответственно, $k = 1,49, 1,32$ или $1,48$. Оптимальная смесь, состоящая из целлюлазы, пектиназы и гемицеллюлазы в соотношении 0,5Ц+0,1ПЛ+0,4(ЭА+АКГ), приводила к $\Omega 18\%$, $k = 2,84$. Из 100 г сухого субстрата СЖ было получено 6.3 г арабинозы, 2.5 г фруктозы и 10.9 г глюкозы.

На основе результатов гидролиза ЯВ и СЖ очищенными ферментами был подобран комплекс промышленных и лабораторных мультиферментных препаратов, обеспечивающий полную конверсию субстратов до моносахаров.

СОЗДАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ РИБОФЛАВИНА НА ОСНОВЕ *B. SUBTILIS* С ПОМОЩЬЮ БЕЗМАРКЕРНОЙ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS

Майорова К.А.¹, Калашников М.В.¹, Селимзянова А.И.², Березина О.В.², Рыков С.В.²

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств,
Москва, Россия;

²ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», Курчатовский комплекс генетических исследований
(ГосНИИгенетика), Москва, Россия

xenia_mayorova@mail.ru

Многие пищевые и кормовые добавки получают биотехнологическим способом с помощью генетически модифицированных микроорганизмов. Для синтеза витамина B2 (рибофлавина) были разработаны и внедрены в практику рекомбинантные штаммы на основе *Bacillus subtilis*. Характеристикой рекомбинантных штаммов является наличие плазмид и генов устойчивости к антибиотикам, внесенных в процессе конструирования штаммов. Данный аспект значительно сужает возможности коммерциализации штаммов и реализации продукции, а также создает серьезную угрозу общественному здоровью.



В связи с задокументированными случаями загрязнения субстанции рибофлавина, жизнеспособными рекомбинантными микроорганизмами и генетическим материалом, содержащим гены устойчивости к антибиотикам, возникла насущная проблема создания штаммов-продуцентов нового поколения. В настоящее время значительно расширился набор эффективных инструментов метаболической инженерии, благодаря чему появилась возможность конструирования новых безопасных штаммов-продуцентов рибофлавина с помощью безмаркерных систем на основе CRISPR/Cas.

Для создания штаммов-продуцентов нового поколения в лаборатории ранее был разработан генно-инженерный инструментарий для редактирования геномов бацилл на основе системы CRISPR/SpyCas9, который успешно применен для создания штаммов-продуцентов рибофлавина. В качестве базового штамма выбран типовой штамм *Bacillus subtilis* 168. Были разработаны и созданы конструкции для геномного редактирования регуляторных элементов оперона биосинтеза рибофлавина. Векторы, которые доставляют конструкции для геномного редактирования в целевые штаммы, обладают термочувствительным фенотипом по репликации, что позволяет с высокой эффективностью отобрать изоляты без векторной плазмиды. Система продемонстрировала успешность при геномном редактировании регуляторных элементов оперона биосинтеза рибофлавина *B. subtilis*, что позволило существенно повысить уровень биосинтеза витамина и обойтись без интеграции в геном маркерных генов устойчивости к антибиотикам.

НАГРЕВАТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА DIY ДЛЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ *IN VIVO*

Мамлеев А.Р., Минлебаев М.Г.

ФГАОУ ВО Казанский Федеральный Университет, Казань, Россия

arsenmamleev2002@gmail.com

В процессе лабораторного исследования подопытное животное обычно долгое время находится на экспериментальной установке. Вследствие этого появляется необходимость в сохранении и поддержании физиологической температуры животного, что осуществляется с помощью дополнительных нагревательных систем, чаще всего вмонтированных в основу, на которой находится объект исследования. Однако коммерчески доступные нагревательные системы характеризуются высокой стоимостью, что ограничивает их использование в нейробиологических исследованиях. Цель настоящего исследования: разработка и создание платформы с подогревом для проведения нейробиологических исследований *in vivo*.

Основным элементом нашей системы подогрева является основа, представленная каркасом из ABS пластика, напечатанным на 3D принтере. Для равномерного распределения тепла в основу платформы вмонтирована пластина из материала с высокой удельной теплопроводностью – алюминиевая пластина размерами 4x50x80 мм.

Нагревательным элементом являются 3 последовательно соединенных цементных резистора (SQP 10 Вт, 2.2 Ом), зафиксированных снизу к алюминиевой пластине с помощью моментного клея с прослойкой из термопасты (КПТ-8).

Контроль работы резисторов и, соответственно, калибровка температуры подогревателя осуществляются с помощью регулятора мощности, представленного системой из стабилизатора напряжения LM2596 DC-DC Module и термодатчика, с встроенным в пластмассовый каркас термистором. Источником питания является блок питания на 12 В.



Созданная система позволяет поддерживать температуру платформы с рабочим диапазоном температур 20-70°C, что включает физиологические температуры большинства живых объектов, используемых в физиологических исследованиях. Ориентировочная стоимость созданной системы составляет менее 1500 рублей, что позволяет сделать и использовать эту систему в лабораториях с низким бюджетом.

ВОЗМОЖНОСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТА ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА У КРОЛИКОВ С ПОМОЩЬЮ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Марченко Д.М.^{1,2}, Божокин М.С.^{2,3}, Михайлова Е.Р.²

¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²ФБГНУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУ НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

berbimot@yandex.ru

Проблема повреждения суставов является актуальной у миллионов людей во всём мире. Поверхностный гиалиновый слой обладает ограниченной способностью к регенерации, поэтому даже небольшие дефекты приводят к его дальнейшей дегенерации. Одним из принципиально новых и перспективных подходов по восстановлению гиалинового хряща является применение ткане-инженерной конструкции (ТИК), которая состоит из биодеградируемого скаффолда и клеточной культуры внутри него.

Цель данной работы заключалась в подготовительном анализе возможности использования фибробластов человека в составе ТИК при замещении дефекта гиалинового хряща у кроликов.

Вся экспериментальная работа прошла соответствующую международным рекомендациям этическую экспертизу. Культура дермальных фибробластов была получена из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ФГБУН института цитологии РАН. Клетки культивировались до третьего пассажа согласно стандартному протоколу. В качестве биодеградируемого скаффолда использовали полилактид. Фибробласты помещали внутрь скаффолда динамическим способом под действием избыточного давления N₂. ТИК культивировали в течение 7 дней.

Исследование проводилось на 12 самках кролика породы «Советская Шиншилла». Всем животным формировали поверхностный дефект в области коленного сустава. Опытной группе (6 самок) производили имплантацию ТИК, в отличие от контрольной группы – без имплантации, но с дефектом. После операции кроликов содержали в стандартных условиях. На 14 и 30 сутки выполняли эвтаназию животных. Образцы коленных суставов фиксировали формалином. Наличие и адгезию ТИК, а также перифокальные реакции в области созданного дефекта гиалинового хряща оценивали визуально.

В течение срока наблюдения летальные исходы не выявлены. У опытной группы было визуально отмечено замещение дефекта регенератом через 14 и 30 суток с момента операции, чего не наблюдалось в контрольной группе. Интегрированная в область хирургического вмешательства ТИК хорошо фиксировалась, ее подвижность не обнаружена.



Применение человеческих фибробластов в составе ТИК позволяет заместить дефект гиалинового хряща у кроликов. Таким образом, при ближайшем рассмотрении данный вариант ТИК может служить основой для дальнейших экспериментов на выбранной животной модели. Авторами планируется проведение дополнительных исследований для анализа эффективности работы ТИК и последующая оптимизация культуры человеческих фибробластов методами белковой и генетической рекомбинации.

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА ДРОЖЖЕЙ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕГО ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК MSCARLET-I, В ПРИСУТСТВИИ ТЕТРАЦИКЛИНА

**Назарова А.А., Мадьярова Е.В., Саранчина А.Е., Гурков А.Н.,
Дроздова П.Б., Тимофеев М.А.**

ФГБОУ ВО Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

annazarova1995@gmail.com

Создание разнообразных сенсоров, чувствительных к антибиотикам и применимых в различных технических условиях, – это важная часть решения проблемы антибиотикорезистентности микроорганизмов, которая остро стоит в сфере аквакультуры и животноводства. Генетически модифицированные дрожжи являются перспективным чувствительным элементом подобных биосенсоров [1]. Ранее для определения содержания антибиотиков тетрациклинового ряда была сконструирована система, в которой репортерным геном является *LacZ*, кодирующий фермент бета-галактозидазу [2]. Однако этот подход требует применения дополнительных химических компонентов для измерения активности фермента. В данной работе представлено получение генетически модифицированных дрожжей для мониторинга уровня антибиотиков тетрациклинового ряда с помощью флуоресцентного белка.

Нами сконструирована плаزمида pCM252 с флуоресцентным белком mScarlet-I. Индукцию трансформированных этой плазмидой дрожжей проводили в течение суток с использованием 1 мг/л тетрациклина или окситетрациклина. Экспрессию репортерного белка определяли на флуоресцентном микроскопе с подключенным спектрометром QE Pro (OceanOptics, США).

Спектральный анализ позволил обнаружить повышение интенсивности пика флуоресценции белка mScarlet-I в присутствии обоих антибиотиков тетрациклинового ряда, хотя в случае окситетрациклина интенсивность флуоресценции оказалась ниже. Визуальная оценка показала наличие порядка 2% светящихся клеток в условиях без антибиотиков и 43% клеток в присутствии тетрациклина. Таким образом, полученная плаزمида pCM252-mScarlet-I является перспективным компонентом для создания биосенсора, не требующего дополнительных реактивов для снятия показаний.

Исследование поддержано грантом РФФ № 20-64-47011.

Литература.

1. Miller R.A. et al. Development of a paper-immobilized yeast biosensor for the detection of physiological concentrations of doxycycline in technology-limited settings // *Analytical Methods*. – 2020. – V. 12. – №. 16. – P. 2123-2132.
2. Bellí G. et al. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast // *Nucleic acids research*. – 1998. – V. 26. – №. 4. – P. 942-947.



ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКООШИБОЧНОЙ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ REV1 ЧЕЛОВЕКА ИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО И ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ПРОДУЦЕНТОВ

Новикова А.А.^{1,2}, Столяренко А.Д.¹, Шилкин Е.С.¹, Полтораченко В.А.¹, Макарова А.В.¹

¹ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», Институт молекулярной генетики, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Москва, Россия

annnovikova00@icloud.com

Повреждения ДНК блокируют работу высокоточных репликативных ДНК-полимераз и являются источником нестабильности генома. Синтез ДНК в поврежденных участках, которые не были репарированы до очередного раунда репликации, осуществляется специализированными высокоошибочными ДНК-полимеразами, формирующими комплекс – транслесому – в ходе транслезионного синтеза. Нарушение работы транслезионных ДНК-полимераз приводит к повышенной чувствительности клеток к ДНК-повреждающим агентам и может вызывать их канцерогенное перерождение. Кроме того, транслезионный синтез играет роль в формировании устойчивости к химиотерапии, а некоторые транслезионные ДНК-полимеразы рассматриваются в качестве терапевтических мишеней при онкологических заболеваниях.

REV1 – ключевая транслезионная ДНК-полимераза эукариот, действующая как цитидинтрансфераза и служащая платформой для сборки транслесомы. ДНК-полимеразная активность REV1 реализуется каталитическим доменом в центральной части белка, регуляторная – С-концевым доменом, который легко отщепляется при выделении. В целях разграничения каталитической и структурной функций REV1 человека и изучения роли REV1 в канцерогенезе и лечении онкологических заболеваний в лабораториях мира предпринимаются попытки получения препаратов интактного полноразмерного рекомбинантного белка.

В нашей работе предложены методики выделения рекомбинантного белка REV1 человека с помощью отщепляемого GST-тэга из бактериального продуцента *E. coli* и эукариотического продуцента в клетках *S. cerevisiae*. Препарат, полученный из *E. coli* с помощью трехстадийной аффинной хроматографии, оказался в значительной степени протеолизирован, но активен. Из дрожжевых клеток удалось получить не только высокоактивный, но и полноразмерный препарат REV1 после двух стадий аффинной хроматографии. Первую стадию очистки проводили на сорбенте глутатион-сефароза с последующим отщеплением GST-тэга риновирусной 3С протеазой. Вторая стадия заключалась в сорбции на ДНК-подобном носителе гепарине. В соответствии с литературными данными, оба препарата REV1 осуществляли включение преимущественно dCMP напротив неповрежденных ДНК-матриц и двух наиболее распространенных повреждений ДНК, АП-сайта и 8-оксогуанина.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-14-00354-П.



ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ МАКРОСОЛЕЙ В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ ВИНОГРАДА *IN VITRO*

Окулова Е.А., Алексеева С.Э., Хусаинова А.Р., Сергеев Р.В.

ФГБОУ ВО «Поволжский государственный технологический университет»,
Йошкар-Ола, Россия

katya-okulova00@mail.ru

Виноград (лат. *Vitis L.*) используют с древних времен. Особенно ценятся у виноградной лозы ягоды, его используют в виноделии и едят в свежем виде. Качественный посадочный материал можно получить только в специализированных лабораториях. Преимуществами культивирования *in vitro* растений в сравнении с традиционными методами являются: значительно более высокий коэффициент размножения, миниатюризация процесса, оздоровление посадочного материала от болезней и вредителей [1]. Экспериментально доказано, что культивирование клонов, свободных от системных и хронических заболеваний, значительно повышает продуктивность винограда и его качество, долговечность насаждений и устойчивость их к неблагоприятным факторам среды [2, 3].

Материалом для исследования стали экспланты винограда трех сортов номеров 1, 2, 3. Для изучения влияния состава питательной среды на морфогенез винограда были приготовлены безгормональные питательные среды Мурасиге-Скуга (Murashige T., Skoog F., 1962) с разными концентрациями макроэлементов и шагом 12,5 мл/л (получилось 8 вариантов среды с концентрациями макроэлементов 12,5; 25; 37,5; 50 (MS); 62,5; 75; 87,5 и 100 мл/л). В экспериментах учитывали: высоту стебля, количество листьев, количество корней и длину корней. Измерения проводили в течение 28 дней.

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что для всех исследуемых сортов винограда низкая концентрация макроэлементов в среде культивирования оказывает положительное влияние на морфогенез *in vitro*.

Из трех исследуемых клонов лучшие показатели роста стебля были отмечены у клона 3 на питательной среде с концентрацией макроэлементов 12,5 мл/л. А лучшая среда для укоренения у клона 1 с концентрацией макроэлементов 12,5 мл/л.

Работа выполнена с использованием ресурсов ЦКП «Экология, биотехнологии и процессы получения экологически чистых энергоносителей» Поволжского государственного технологического университета, г. Йошкар-Ола при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение № 075-15-2021-674).

Литература.

1. Grenan S. Micropropagation of Grapevine (*Vitis vinifera L.*) / S. Grenan // Biotechnology in Agriculture and Forestry 18. High-Tech and Micropropagation II. – 1992. – С. 371-398.
2. Скороход В.О. Промислова біотехнологія мікроклонального розмноження винограду в культурі «*in vitro*» / В.О. Скороход – Херсон: Айлант. – 2000. – С. 327.
3. Мулюкина Н.А. Вирусные болезни винограда и их влияние на виноградное растение / Н.А. Мулюкина // Виноградарство і виноробство. – 2004. – Т. 41. – С. 45–53.



ХАРАКТЕРИСТИКА ВЯЗКО-УПРУГИХ СВОЙСТВ ПЕКТИНОВЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ

Патлай А.А.

ФГАОУ ВО «Дальневосточный Федеральный Университет», Владивосток, Россия

patlai.aa@students.dvfu.ru

Перспективным применением гидрогелей является использование их в качестве матричного материала в регенеративной медицине и трансплантологии для ремоделирования структуры ткани, доставки клеток или лекарственных веществ. При этом желательно, чтобы механические характеристики биоматериала совпадали с характеристиками ткани, куда производится трансплантация.

Пектиновые гидрогели в этом аспекте перспективны за счёт своей высокой биосовместимости, контролируемому времени биодеградации, а также из-за их сходства с гиалуроновой кислотой – основным компонентом внеклеточного матрикса.

Цель этой работы – дать характеристику вязко-упругим и биологическим свойствам пектиновых гидрогелей разного химического состава, полученных методом ионного желирования.

Для сравнения были взяты пектины со степенью этерификации (СЭ) 0 и 50% (далее П-0 и П-50, соответственно). Материалы были охарактеризованы методами атомно-силовой микроскопии (АСМ) и реологического анализа.

Реологические исследования показали, что гидрогели П-0 демонстрируют экспоненциальную зависимость модуля накопления (G') в диапазоне от 4 до 830 Па, а П-50 – экспоненциальную зависимость G' в диапазоне от 12 до 630 Па. Пары образцов П-0 1,25% и П-50 3%, П-0 1,5% и П-50 4,5% демонстрируют схожие значения G' : около 100-110 Па и 400-500 Па соответственно. Средний размер пор гидрогелей, определенный в результате сканирования поверхности геля в полуконтактном режиме атомно-силовой микроскопии, составил 870 нм для П-0 1,5% и 970 нм для П-50 3%.

Анализ метаболической активности культивируемых в материале клеток методом МТТ показал сходное снижение показателей, в сравнении с контрольной группой.

Вывод: физические свойства пектинов с разной СЭ в определенных концентрациях оказываются одинаковыми, совпадает и морфология материалов. Подобные образцы оказывают схожее действие на поведение клеток.

Благодарность за проведение исследований методами динамической реологии и АСМ:

Центр геномной и регенеративной медицины ДВФУ, Лаборатория биохимической инженерии ДВФУ, Лаборатория биомедицинских клеточных технологий ДВФУ

Литература.

1. Willats, W.G. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. – 2001. № 47. – P. 9–27.
2. Belousov A. Hydrogels based on modified pectins capable of modulating neural cell behavior as prospective biomaterials in glioblastoma treatment. *International Review of Neurobiology*. – 2020. №151. – P.111-138.
3. Elosegui-Artola A. The extracellular matrix viscoelasticity as a regulator of cell and tissue dynamics, *Current Opinion in Cell Biology*. – 2021. №72. – P.10-18.



КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГИБРИДНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГЛАВНЫХ АНТИГЕННЫХ ДОМЕНОВ ГЛИКОПРОТЕИНА E2 ВИРУСА ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА 2-ГО ТИПА В ШТАММАХ *ESCHERICHIA COLI*

Пластинина О.В., Сауткина Н.В., Прокулевич В.А.

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

oksana02plastinina@gmail.com

Вирусная диарея крупного рогатого скота вызывается группой вирусов BVDV (Bovine Viral Diarrhoea Virus), относящихся к роду *Pestivirus* семейства *Flaviviridae*. Это широко распространенное экономически важное заболевание.

Гликопротеин E2 оболочки вируса является иммунодоминантным антигеном, обеспечивающим образование сильных нейтрализующих антител, а его первые домены А и В, отвечающие за связывание вируса с мембраной клетки и проникновение в неё, могут выступить основой для создания субъединичной вакцины.

В результате прошлых этапов работы получены штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды pDADB (ген *DADB* клонирован на сайтах NdeI и EcoRI) и pDADBHis (ген *DADBHis* клонирован на сайтах NdeI и XhoI) с генами, кодирующими антигенные домены А и В. Установлено, что белки DADB и DADBHis, как и полноразмерный белок E2, синтезируются в нерастворимой форме, возможно из-за высокого содержания в молекуле остатков цистеина, образующих дисульфидные связи. Для получения в клетках бактерии *E. coli* растворимого и правильно свернутого белка возможно использование технологии получения фьюжн-белков.

Целью данной работы являлось клонирование и экспрессия в клетках *E. coli* гибридных конструкций *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis*, состоящих из генов, кодирующих главные антигенные домены А и В гликопротеина E2 BVDV 2-ого типа, объединенных с растворимым белком малым убиквитин-подобным модификатором (SUMO) дрожжей *S. cerevisiae*.

Для получения гибридных генов нуклеотидную последовательность *SUMO* по сайту рестрикции NdeI вводили в плазмиды pDADB и pDADBHis. Далее после проверки правильности ориентации вставки *SUMO* рестрикционным и ПЦР-анализом рекомбинантными плазмидами pSUMO-DADB и pSUMO-DADBHis трансформировали клетки штамма *E. coli* BL21 (DE3). В результате проведения индукции экспрессии генов ИПТГ (0,5 мМ) в течение 4 ч при температуре культивирования 37 °С с помощью SDS/PAGE электрофореза зафиксировали наличие в клетках продуктов, по массе соответствующих целевым белкам. Также, проведя индукцию экспрессии генов ИПТГ (0,5 мМ) при 37 °С (4 ч) и 20 °С (16 ч) и разрушив наработанные клетки, с помощью SDS/PAGE электрофореза установили накопление целевого белка преимущественно в нерастворимой клеточной фракции.

Таким образом, получены штаммы-продуценты рекомбинантных фьюжн-белков *SUMO-DADB* и *SUMO-DADBHis*, несущих в своём составе А и В домены гликопротеина E2 оболочки вируса BVDV 2-го типа, объединенных с белком малым убиквитин-подобным модификатором дрожжей *S. cerevisiae*.



РАЗРАБОТКА МИКРОФЛЮИДНОГО УСТРОЙСТВА ДЛЯ СИНТЕЗА АЛЬГИНАТНЫХ МИКРОЧАСТИЦ С КЛЕТКАМИ ДЛЯ ТРЕХМЕРНЫХ БИОЧЕРНИЛ

Плешаков П.С.¹, Филатов Н.А.¹, Тюшкевич А.А.¹, Наумов Е.И.¹, Букатин А.С.^{1,2}

¹ФГБУ ВОИ Санкт-Петербургский национально-исследовательский академический университет имени Ж.И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

avekip@gmail.com

Разработка лекарств является дорогостоящим и трудоемким процессом. Во многом это связано с несовершенством моделей тестирования. Например, тесты на животных, на клеточных культурах не полностью информативны для человека. Одной из современных технологий для создания качественных моделей является 3Д биопечать органов или отдельных функциональных элементов органа. В качестве материала печати используются 3Д биочернила. Использование в качестве чернил массива гидрогелевых микрочастиц с клетками, в отличие от простых биочернил, могут позволить точнее формировать орган за счет компактных размеров (50-200 мкм), за счет сочетания различных клеточных культур в разных частицах. Для создания таких биочернил одним из перспективных инструментов являются технологии капельной микрофлюидики.

В работе были разработаны микрофлюидные чипы для формирования микрочастиц из альгината натрия. Исследовались методы формирования водных макроэмульсий и микрочастиц в таких чипах. В качестве гидрогеля использовался альгинат натрия. Для инкапсуляции применялась клеточная линия карциномы толстой кишки мыши СТ26, экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок (GFP). Для формирования микрочастиц чипы имели генераторы макроэмульсии по типу фокусировки потока. Центральная водная фаза, содержащая клетки, смешивалась с потоком водной фазы раствора альгината натрия с комплексом Са-ЭДТА. Объединенный поток водной фазы эмульгировался в микрокапли во фторуглеродном масле. Далее они попадали в поток фторуглеродного масла с добавлением уксусной кислоты. Ионы водорода от кислоты снижали уровень pH и приводили к диссоциации комплекса Са-EDTA с последующим высвобождением ионов кальция, сшивая альгинат. Гидрогелевые микрочастицы переводились в культуральную среду и инкубировались при 37°C и 5% CO₂. Жизнеспособность клеток оценивалась по флуоресценции GFP.

В результате исследований были созданы экспериментальные образцы микрочипов, а также были изучены методы формирования монодисперсных альгинатных микрочастиц (в диапазоне диаметров 50-300 мкм). Получены зависимости диаметра микрокапель водной эмульсии «вода-в-масле» и альгинатной эмульсии от давлений/расходов жидкостей. Также отработаны методы упаковки клеток в микрочастицы внутри микрочипа и их дальнейшее инкубирование. Данные показывают, что разрабатываемая система может использоваться для формирования базового конструктивного материала для 3Д биочернил.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-74-10117.



ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ЖЕЛЧИ ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ЖЕЛТУХЕ
РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ, МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО
РАССЕЯНИЯ СВЕТА

**Приземин В.Н.¹, Голубова Н.В.¹, Кандурова К.Ю.¹, Сумин Д.С.²,
Мамошин А.В.², Потапова Е.В.¹**

¹ФГБОУ ВО Научно-технологический центр биомедицинской фотоники ОГУ
им. И.С. Тургенева, Орел, Россия;

²Орловская областная клиническая больница, Орел, Россия

vprizemin@gmail.com

Диагностика и лечение заболеваний органов гепатопанкреатодуоденальной зоны, осложнённых обструкцией желчевыводящих путей, остаётся актуальной проблемой хирургии. Механическая желтуха – патологический синдром, обусловленный нарушением оттока желчи из желчных протоков при наличии препятствия к выделению билирубина с желчью в кишечник. Определение причин механической желтухи является сложной задачей, которая определяет тактическую позицию в лечении данной патологии. Целью данного исследования является изучение влияния характера этиологического фактора механической желтухи на свойства желчи методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР).

Метод КР относится к колебательной молекулярной спектроскопии и дает возможность получить индивидуальный спектральный отпечаток, уникальный по отношению к рассматриваемой структуре. Для исследования были отобраны образцы желчи, полученной у больных с механической желтухой различной этиологии в ходе выполнения антеградной билиарной декомпрессии желчевыводящих путей. На данном этапе исследовались 3 образца желчи, полученной у больных с онкологическим диагнозом, и 3 образца желчи, полученной у больных с желчекаменной болезнью. Для измерений использовалась установка (Ocean Optics Inc., США), включающая в себя: спектрометр QEPRO-RAMAN со спектральным диапазоном 780-935 нм, лазер 785-LAB-ADJ с длиной волны 750 нм, держатель для кювет 10x10 мм OOA-HOLDER-RFA RamanSample Holder и зонд RIP-RPB-785-FC-SMA. Исследования проводились при мощности лазера 30 мВт с экспозицией 20 с. Выполнялась предобработка данных с помощью программного обеспечения Origin (OriginLab Corporation). Спектры КР позволили выделить пики интенсивности, характерные для желчи (1255-1260 см⁻¹ и 1606-1616 см⁻¹). Дополнительно была исследована желчь одного пациента при наличии опухолевого блока желчевыводящих путей в воротах печени. При этом забор желчи осуществлялся во время раздельной пункции разобщенных желчевыводящих систем правой и левой долей печени. Спектры КР обеих долей значительно отличались. Это можно объяснить тем, что в разных долях печени неравномерно выражено нарушение функционального состояния, что отражается на составе желчи и изменяет ее свойства.

Таким образом, полученные данные подтверждают перспективность исследования причин механической желтухи с использованием метода КР.

Исследование выполнено при поддержке РФФ в рамках проекта № 21-15-00325.



ПОЛУЧЕНИЕ ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ МИКРОКОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Райхман Е.В.^{1,2}, Шубина С.С.^{3,2}, Хаблюк В.В.¹, Антонова О.Ю.², Кочеткова О.Ю.²

¹ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия;

²ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пушкино, Россия;

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Москва, Россия

elenaraikhman@ya.ru

Классическая химиотерапия для лечения солидных опухолей обычно подразумевает использование низкомолекулярных, цитотоксических препаратов, таких как, паклитаксел, доксорубин и др. Поиски новых форм лекарственных препаратов, позволяющих снизить высокую токсичность и увеличить биодоступность, привели к развитию наномедицины и использованию микро- и наносистем для доставки химиотерапевтических препаратов и других биологически активных веществ (БАВ). Для контролируемого высвобождения БАВ температура является наиболее эффективным и безопасным стимулом, помимо этого локальное повышение температуры опухоли может приводить к ее термоабляции.

Были получены термочувствительные полиэлектролитные микрокапсулы (ПЭМК), содержащие в качестве нагревателей полупроводниковые нанокристаллы сульфида меди, полученные биоминерализацией с альбумином (CuS-BSA). Для иммобилизации наноагрегатов в ПЭМК были выбраны две схемы включения: через ядро методом копреципитации и сорбцией в оболочку, т.е. методом адсорбции. В качестве термочувствительного слоя на поверхности карбонатных микрочастиц был сформирован липидный слой (стреариновая, лауриновая кислоты, лецитин и ПЭГ) содержащий, липофильный краситель Нильский красный (NR), как модель низкомолекулярных БАВ. Показано, что эффективность включения NR составляла более 70%. Полученные ПЭМК демонстрируют высокую стабильность при хранении, так выход NR при инкубировании в течении 7 суток не происходил. Исследование фотоконверсии при облучении полученных ПЭМК излучением 808 нм мощностью 3 Вт/см² показало, что максимальная ΔT 11°C была у ПЭМК, с наночастицами включенными копреципитацией, а при адсорбции ΔT составляла 4°C. При этом термо-индуцированное высвобождение NR при облучении мощностью 3 Вт/см² в течении 5 мин составляло более 80%.

Исследовано взаимодействие микрокапсул с клетками нейробластомы SH-SY-5Y. Зафиксирован значительный внутриклеточный нагрев при опсонизации клеток микрокапсулами.

Таким образом, были получены термочувствительные ПЭМК, обеспечивающие эффективное включение модельных соединений и контролируемое высвобождение.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-74-10097.



ВЛИЯНИЕ АПКОНВЕРСИОННЫХ ЧАСТИЦ НА БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОД *EULIMNOGAMMARUS VERRUCOSUS*

Ржечицкий Я.А., Назарова А.А., Болбат Н.Б., Снхчян Ц.А.,
Гурков А.Н., Тимофеев М.А.

ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», НИИ Биологии ИГУ,
Иркутск, Россия

rzhechitskiy.yar@gmail.com

Апконверсионные частицы (АЧ) – это антистоксовские люминофоры на основе оксидов лантаноидов, которые преобразовывают инфракрасное излучение в люминесценцию в видимой части спектра. Это свойство АЧ позволяет исключить автофлуоресценцию тканей организма при их использовании в качестве компонентов различных контрастов для медицинской визуализации или имплантируемых оптических сенсоров. В ряде исследований показана низкая цитотоксичность АЧ в культурах клеток (Sotiriou et al., 2012), однако примеры оценки их влияния на организм в целом всё ещё малочисленны. Важность данной оценки обусловлена возможным выходом ионов лантаноидов из АЧ, что потенциально может приводить к ингибированию жизненно важных ферментов организма (Pałasz& Czekaj, 2000). В данной работе нами было оценено влияние коммерчески доступных АЧ, представляющих большой интерес для создания имплантируемых сенсоров, на байкальских эндемичных амфипод (Amphipoda, Crustacea).

Частицы РТИР 545/F (Phosphor Technology, Великобритания) использовали как без дополнительных модификаций, так и после покрытия кремнеземной оболочкой для исключения выхода ионов лантаноидов. АЧ иммобилизовали в нитях полиакриламидного геля диаметром 300 мкм, после чего гели без частиц и с двумя типами АЧ (1 мг/мл) вводили в уросому амфипод *Eulimnogammarus verrucosus* (Gerstfeldt, 1858). Оценивали выживаемость амфипод и активность антиоксидантных ферментов. Кроме того, в первичной культуре гемоцитов амфипод оценивали цитотоксичность среды L-15 Лейбовича, контактировавшей с данными гелями в течение различного времени.

Влияния АЧ на выживаемость взрослых особей *E. verrucosus* не обнаружено в течение трёх недель, а цитотоксичности в культуре гемоцитов – в течение недельного эксперимента. В то же время нами выявлено снижение активности глутатион-S-трансферазы и пероксидазы через трое суток после введения гелей с непокрытыми АЧ по сравнению с амфиподами как с введёнными гелями без частиц, так и с гелями с АЧ, покрытыми кремнезёмной оболочкой. В случае каталазы подобного снижения активности не обнаружено.

Таким образом, установлено, что РТИР 545/F не вызывают летальных эффектов, но могут приводить к ингибированию некоторых ферментов, что не позволяет применять их в составе имплантируемых сенсоров без дополнительного покрытия.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-64-46003.



АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ЭКСТРАКТА *MORINGA OLEIFERA*

Тимогина М.И.¹, Мануцян Т.А.², Агаджанян А.А.², Габриелян Л.С.², Грчунян К.А.²

¹Российско-Армянский университет, Ереван, Армения;

²Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

timotina.mar@gmail.com

Moringa oleifera (Моринга масличная) – растение, принадлежащее к семейству Моринговых. Оно известно своим быстрым ростом и высокой урожайностью. Стебли и листья этого растения применяются в кулинарии, а семена используются для получения масла. Благодаря высокому содержанию белков, аминокислот, витамина А, антиоксидантов и флавоноидов данное растение часто применяется в качестве пищевой добавки, в косметологии и в медицине, а экстракт моринги используется в фармакологии благодаря антиоксидантным, противовоспалительным и противоопухолевым свойствам. Кроме того, масло моринги рассматривают как перспективный источник биотоплива.

Антибактериальные свойства *M. oleifera* делают её подходящей платформой для зеленого синтеза наночастиц, которые в будущем могут применяться для борьбы с лекарственной резистентностью патогенных микроорганизмов. Наночастицы, полученные путем зеленого синтеза, вызывают особый интерес со стороны научного сообщества, так как этот метод является более экологически чистым и экономически выгодным.

В данной работе было исследовано влияние наночастиц (НЧ) серебра, полученных из экстракта *M. oleifera*, на параметры роста (удельная скорость роста, рН и окислительно-восстановительный потенциал среды) бактерии *Escherichia coli* BW25113. Наночастицы серебра получались из экстракта растения, выращенного как на почве, так и на гидропонике.

Обнаружено ингибирующее действие наночастиц, полученных из экстракта *M. oleifera*, на параметры роста *E. coli*. При этом ингибирование роста зависело от условий выращивания растения: в присутствии 25 мкг НЧ, полученных из экстракта почвенной моринги, удельная скорость роста бактерии снижалась в 4 раза, тогда как в случае НЧ, полученных на основе гидропонического растения – в 7 раз. Количество жизнеспособных колоний *E. coli* снижалось в присутствии НЧ, полученных из почвенного и гидропонического экстракта, в ~1,4 и 2,2 раза, соответственно. Кроме того, данные НЧ серебра влияли на величину окислительно-восстановительного потенциала и рН ростовой среды.

Таким образом, НЧ серебра, полученные из экстракта *M. oleifera*, проявляют антибактериальную активность в отношении *E. coli* BW25113. Данный эффект зависит от условий выращивания растения: в случае *M. oleifera*, выращенной на гидропонике, наблюдался более выраженный бактерицидный эффект.



КОНСТРУИРОВАНИЕ CRISPR/CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА *BACILLUS SUBTILIS*

Хегай А.А.^{1,2}, Гнучих Е.Ю.¹

¹ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» – Курчатовский геномный центр,
Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет пищевых производств,
Москва, Россия

khegay.anna00@mail.ru

Бактерии рода *Bacillus* популярный объект промышленной биотехнологии, что связано со способностью данных микроорганизмов к синтезу и секреции больших количеств таких веществ, как экзоферменты, витамины, аминокислоты, инсектициды, нуклеозиды и некоторые другие метаболиты. В связи с интересом к бациллам требуются эффективные методы работы с ними. Система редактирования CRISPR/Cas9 – это современный подход к конструированию штаммов – продуцентов с заданными свойствами. Этот метод позволяет быстро вносить локус специфические модификации в геном бактерий без использования генов устойчивости к антибиотикам.

Сконструированная система CRISPR/Cas9 представляет собой челночную плазмиду, содержащую ориджин репликации *Escherichia coli* и термочувствительный ориджин репликации *Bacillus subtilis*, маркеры устойчивости, для селекции плазмиды в бактериальных клетках, ген фермента нуклеазы *cas9*, расположенный под индуцируемым в *B. subtilis* промотором и последовательность, кодирующую sgРНК, расположенную под конститутивным промотором.

Созданная система содержит индуцируемый промотор с широкой амплитудой ответа. Данный промотор эффективно репрессирован за счет наличия двух операторных последовательностей к разным белкам репрессорам, что позволяет совместить на одной плазмиде ген нуклеазы *cas9* и последовательность, кодирующую sgРНК, при этом не оказывая летального действия на *B. subtilis* в состоянии без индукции. При индукции данного промотора происходит синтез нуклеазы Cas9, образование комплекса Cas9 с sgРНК и внесение двунитевого разрыва ДНК в протоспейсере. Репарация двунитевого разрыва ДНК происходит за счет гомологичных последовательностей, также представленных в данной системе.

Секвенирование полученных образцов показало наличие внесенных программируемых модификаций в геноме *B. subtilis*.

Использование данного метода позволяет вносить немаркированные мутации: делеции, инверсии, дупликации, однонуклеотидные замены в хромосоме бактерии и создавать штаммы продуценты на новом технологическом уровне.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ № 075-15-2019-1658.



СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛЕГОЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ *IN VITRO* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ РЕСПИРАТОРНОГО ДИСТРЕСС-СИНДРОМА

**Шевцова Ю.А.¹, Горюнов К.В.¹, Вторушина В.В.¹, Инвиева Е.В.¹, Кречетова Л.В.¹,
Бабенко В.А.², Плотников Е.Ю.², Силачев Д.Н.^{1,2}**

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

yulshevtsova@yandex.ru

Развитие острого респираторного дистресс-синдрома является следствием цитокинового шторма – тяжелой формы системного воспаления. Моделирование иммунных реакций, приводящих к повреждению тканей легких, позволит детальнее изучить механизмы патологического процесса и найти новые терапевтические подходы.

Целью данной работы было создание модели воспаления легочного эпителия *in vitro* для воспроизведения механизмов острого респираторного синдрома, развивающегося в условиях избыточной выработки воспалительных цитокинов иммунными клетками.

При помощи системы RTCA iCELLigence оценивалась пролиферативная активность клеток A549 при совместном культивировании с ЛПС-активированными мононуклеарами (МК) периферической крови в режиме реального времени. Измеряемая во времени характеристика обозначается как клеточный индекс (КИ) и прямо пропорциональна количеству клеток в лунке. При совместном культивировании A549 с МК через 24 часа КИ снижался в 1,5 раз по сравнению с контролем. Добавление ЛПС к совместной культуре A549 и МК приводило к уменьшению КИ в 2-3 раза, что свидетельствует о снижении пролиферации клеток A549.

После суточного сокультивирования A549 с ЛПС-стимулированными МК был проанализирован цитокиновый состав среды. Концентрация IL-1a, IL-1b и IL-1Ra достигала 62 (± 31) пг/мл, 89 (± 45) пг/мл и 2227 (± 1114) пг/мл соответственно. Содержание IL-6 составляло до 7088 (± 3544) пг/мл, а концентрация TNF-a – до 1284 (± 642) пг/мл. Значительное повышение концентраций цитокинов соотносится с таковым при цитокиновом шторме. При стимулировании клеток A549 липополисахаридом уровень цитокинов и хемокинов не изменялся.

Дексаметазон успешно применяется в клинической практике для купирования активности цитокинового шторма. При добавлении дексаметазона в совместную культуру A549 и ЛПС-активированных МК КИ оставался на том же уровне, что и в контроле.

Анализ жизнеспособности при помощи цитометра MUSE, основанный на дифференциальной проницаемости мембраны живых и мертвых клеток для ДНК-связывающих красителей показал, что количество мертвых A549 в контрольных лунках, с ЛПС-активированными МК, ЛПС-активированными МК и дексаметазоном 4,8%, 11,3%, 7,9% соответственно.

Таким образом, нам удалось создать *in vitro* модель повреждения легочного эпителия и добиться ее воспроизводимости.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-04-60270/20.



ПОЛУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ ПРИ КРИООХЛАЖДЕНИИ ПОВЕРХНОСТИ ПОД КИПЯЩИМ СЛОЕМ ЖИДКОГО АЗОТА

Шестакова В.А.¹, Смирнова А.Н.^{1,2}, Барановский Д.С.¹, Клабуков И.Д.^{1,2}, Кодрян М.А.²

¹Обнинский институт атомной энергетики – филиал ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский ядерный университет «МИФИ», Обнинск, Россия;

²ФГБУ, НМИЦ радиологии МЗ РФ, Москва, Россия

schestakova.vika2017@yandex.ru

Актуальность. Получение тонких срезов нефиксированных биообразцов возможно с использованием дорогостоящих криотомов или вибротомов. Сохранение целостности микроструктуры образца делает невозможным его погружение в криогенную жидкость. Однако использование различных теплообменников позволяет получить биологические срезы с сохраненной микроструктурой. Использование эффекта поверхностного натяжения жидкого азота теоретически позволяет использовать теплообменники простой конструкции на основе микроволокнистого материала, без непосредственного контакта криогенной жидкости с охлаждаемым материалом.

Цель. Изучить возможность использования волокнистого материала, смоченного жидким азотом, для охлаждения образцов и разработка способа криоохлаждения поверхности образца под кипящим слоем жидкого азота при изготовлении тканевых срезов.

Материалы и методы. В экспериментах были использованы биообразцы мышечной ткани, два образца микроволокнистого материала: материал-1 (диаметр пор 2-3 мкм, плотность 1,125 г/м²) и материал-2 (диаметр пор 5-8 мкм, плотность 2,75 г/м²), микротом с зажимами для фиксации используемых образцов тканей, жидкий азот и пирометр IR-T1 Condrol для измерения температуры образцов в диапазоне от -50°C до 600 °C. Обработка материалов жидким азотом проводилась капельно, до полного смачивания поверхности. Контролем для данного эксперимента являлись те же образцы мышечной ткани, но охлаждение поверхности образцов происходило непосредственно, без использования материала.

Результаты. При смачивании микроволокнистого материала жидким азотом наблюдалось снижение температуры в зависимости от свойств материала (диаметр пор и плотность). В отсутствие материала смачивание жидким азотом приводило к растрескиванию поверхности биообразца вследствие быстрого охлаждения в среднем на -15,9°C от начальной температуры. При использовании материала поверхности образцов не разрушались, а температура каждый раз стабильно снижалась от начальной температуры в среднем на -9,1°C или -5,1°C в зависимости от свойств материала. При этом увеличение плотности материала было ассоциировано с меньшим охлаждением биообразца. Подана заявка на получение патента на изобретение.

Выводы. Опосредованное охлаждение биологических образцов под кипящим слоем при использовании в качестве теплообменника пористых микроволокнистых материалов может использоваться как простой и дешевый способ получения тканевых срезов для биологических исследований.



ПОДБОР УСЛОВИЯ ГИДРОЛИЗА ИЗОЛЯТА БЕЛКА СОИ ФЕРМЕНТНЫМ
ПРЕПАРАТОМ ПРОТОСУБТИЛИН ГЗХ В ЛАБОРАТОРНОМ И
ПОЛУПРОМЫШЛЕННОМ МАСШТАБЕ

Шилов С.В., Поздняков Н.В., Лукин А.М., Согорин Е.А.

ФИЦ ПНЦБИ Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН,
Пушино, Россия

sergie_@list.ru

Население Земли постоянно растёт, а вместе с ним растёт и потребление продуктов питания животного происхождения, что приводит к ряду экономических и экологических проблем, связанных с расширением животноводства и сопутствующим возрастанием нагрузки на земельные и водные ресурсы. В связи с этим актуальным является поиск альтернативных источников белка. Одним из таких источников является растительный белок. Соевый белок имеет высокий потенциал в качестве замены животному белку, так как соответствует суточной потребности человека в аминокислотах: наблюдается дефицит только метионина. Однако в соевом белке содержатся ингибиторы протеолитических ферментов пепсина ЖКТ человека, что приводит к снижению усвояемости белка. Для решения этой проблемы из сырья получают концентраты и изоляты белка, а также расщепляют макромолекулы белка до пептидов в процессе гидролиза.

Исследования ферментативного гидролиза различных белков проводились ранее, однако лабораторные протоколы мало связаны с условиями производства и не дают полного представления о том, как будет протекать процесс при масштабировании.

Целью данной работы являлся подбор оптимальных условий гидролиза изолята белка сои Шаньсунь 90 (ИБС) ферментативным препаратом Протосубтилин ГЗх (ПС) в лабораторном и полупромышленном масштабе и их сравнение между собой.

Эксперименты в лабораторном масштабе проводили в микропробирках объемом 2 мл на твердотельном термостате, а в полупромышленном масштабе – в гомогенизаторе «Измельчитель-смеситель ИС-5». За стандартные условия эксперимента были приняты температура 40°C и активность 6,7 ед/г ИБС без контроля рН. При подборе оптимальной температуры были использованы 30, 40, 50 и 60°C, при подборе активности ПС – 1,5, 5,9, 11,8 и 17,8 ед. на 1 г ИБС. При подборе рН вместо деионизированной воды использовали фосфатные буферы с рН 3 и 5 и боратный буфер с рН 9. Отбор образцов проводился через 10, 30, 60, 90 и 120 после начала реакции. О степени гидролиза судили по накоплению ТХУ-растворимых пептидов, определяемых Биуретовым методом после осаждения белка с помощью ТХУ.

Показано, что полупромышленный эксперимент позволяет точнее определить оптимальные параметры для проведения реакции. Так, в лабораторном масштабе отсутствовала разница между образцами в диапазоне температур 40-60°C, глубина гидролиза росла с увеличением активности ПС, оптимальным рН было 5. Полупромышленный эксперимент показал, что достаточной активностью является 6,7 ед/1 г ИБС, оптимальной температурой – 50°C, а необходимость в поддержании оптимального значения рН отсутствует.



СПОСОБ МОДИФИКАЦИИ НЕЙЛОНОВЫХ ВОЛОКОН СВЕТ-ТРАНСФОРМИРУЮЩИМИ НАНОЧАСТИЦАМИ

Шляпников Ю.М., Антонова О.Ю., Канев И.Л., Кочеткова О.Ю., Шляпникова Е.А.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

yuri.shlyapnikov@gmail.com

Клеточные скаффолды с оптимальной топологией и инкорпорированными наночастицами-наноагрегатами позволяют управлять «состоянием» клеток с помощью внешнего физического воздействия. Предложен новый способ ковалентной иммобилизации свет-трансформирующих наночастиц CuS-БСА на нейлоновых волокнах, включающий стадию восстановления амидных групп нейлона действием алюмогидрида лития в диэтиловом эфире. Оптимизированы условия для эффективной модификации волокон. Показано, что особое значение имеет время обработки, так как продукт восстановления нейлона – алифатический полиамин – обладает высокой растворимостью. Показано, что краткосрочное (до 60 с) действие алюмогидрида лития позволяет получить высокую плотность частиц на поверхности без нарушения нанотопологии волокон. Проведено исследование деградации полученных нанокompозитных скаффолдов при длительной инкубации в водном растворе. Инкубирование в PBS в течение недели при 37°C не оказывает существенного влияния на плотность частиц на волокнах, что подтверждает высокую надежность покрытия поверхности свет-трансформирующими частицами. Это дает основание предполагать, что при применении разрабатываемых скаффолдов *in vivo* не будет происходить десорбция частиц с поверхности волокон, и эффективность фотоконверсии не снизится. Для исследования влияния полученных нанокompозитных материалов на жизнеспособность клеток в качестве модельного объекта были выбраны клетки нейроblastомы человека IMR-32. Поверхность скаффолда не подвергалась дополнительной обработке соединениями, усиливающими адгезию клеток. Клетки культивировали на модифицированных наночастицами нановолокнах в течение 3 дней и окрашивали кальцеином и йодидом пропидия (PI). Отсутствие PI-положительных клеток свидетельствует о том, что полученные нанокompозитные скаффолды с наночастицами CuS-БСА не токсичны для клеток и, следовательно, биосовместимы.

Работа поддержана грантом РФ № 19-74-10097.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕМТОГРАММОВЫХ КОЛИЧЕСТВ БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ

Шляпников Ю.М., Малахова Е.А., Канев И.Л., Шляпникова Е.А.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

ribboni@yandex.ru

Метод Вестерн-блоттинга широко используется в медицине и молекулярной биологии для обнаружения белков с высокой специфичностью в смесях сложного состава. Целью данной работы являлась разработка простого и быстрого способа выявления фемтограммовых количеств белка из смеси сложного состава объемом несколько десятков микролитров, не



требующего дорогостоящего оборудования и пригодного для использования в обычной биохимической лаборатории. Предложен новый оригинальный способ проведения иммуноблоттинга без переноса продуктов разделения на мембрану, отличающийся простотой и быстротой. Электрофоретическое разделение образца проводят в неденатурирующих условиях в тонком проводящем слое между целлюлозными мембранами в отсутствие полиакриламидного геля. Поверхность мембраны предварительно модифицируют азидофенильными группами для фотохимической иммобилизации белков *in situ*. После электрофореза и обработки мембраны УФ-облучением белковые полосы визуализируют с помощью магнитных частиц, покрытых специфическими к определяемому белку антителами. Для этого частицы наносят на рабочую зону мембраны и притягивают к поверхности с помощью магнита, затем несвязавшиеся частицы удаляют магнитом с концентратом. Показано, что предел обнаружения в модельной системе с биотинилированным БСА и магнитными частицами, покрытыми стрептавидином, достигает 10 фг или около 10^5 молекул при общем времени анализа около 5 минут. Применение метода продемонстрировано обнаружением IgA в образце выдыхаемого человеком воздуха. Метод может быть полезен при анализе различных сложных биологических образцов, содержащих низкие количества аналита.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-75-10025.

АНАЛИЗ СВОЙСТВ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ШЛЕМНИКА БАЙКАЛЬСКОГО

Шмарова А.А.¹, Данилов Л.Г.², Пивоварова Н.С.¹, Маймистов Д.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет»,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

shmarova.aleksandra@pharminnotech.com

В соответствии с концепцией «Индустрия 4.0» одним из перспективных направлений становится применение роботизированных и автоматизированных интеллектуальных систем, в том числе для выполнения операций с культурами растительных клеток в условиях *in vitro*. Появляются возможности введения в культуру *Scutellaria baicalensis* (шлемника байкальского), содержащего комплекс ценных биологически активных веществ (БАВ). Данные соединения обладают выраженным антиоксидантным, противовирусным и противовоспалительным действием, что особенно важно при создании эффективных иммунопротекторных препаратов в эпоху COVID-19.

В рамках данного исследования получена суспензионная культура *S. baicalensis* и проведен анализ ростовых характеристик клеточной биомассы. Суспензионную культуру шлемника получали из кусочков рыхлого каллуса (масса инокулюма 1,5-2,0 г) путем их помещения в жидкую питательную среду. Среду готовили по стандартной прописи Мурасиге-Скуга с добавлением регуляторов роста и витаминов (рН до автоклавирования – 5,5-5,7). Культивирование осуществляли в колбах Эрленмейера (объем среды 50 мл), установленных на качающейся платформе при скорости 100 ± 2 об/мин. Жизнеспособность клеток определяли методом микроскопии с окрашиванием клеток 0,1% раствором нейтрального красного.



Установлено, что 80-89% клеток шлемника оставались жизнеспособными. Снижение жизнеспособных структур наблюдалось на стадии деградации клеток (21-22 день).

Получена характерная S-образная кривая роста и данные по изменению рН. Ростовой цикл суспензионной культуры составлял 20-22 дня. Латентная фаза длилась 2 суток с уменьшением кислотности среды до 5,0-5,2. После наступала экспоненциальная фаза роста с процессами активного деления клеток шлемника (5 суток) и наблюдалось увеличение рН до 5,9-6,0. На 8-18 сутки клетки вступали в фазу линейного роста с интервалом изменения кислотности 6,2-6,5, и далее в стационарную фазу (20-22 сутки). При анализе состояния биомассы не выявлено снижения жизнеспособности клеток при сдвиге рН в кислую среду.

На 22-е сутки биомасса обнаруживала склонность к деградации. Период субкультивирования характеризовался приростом биомассы примерно в 3,9-4,7 раза.

Полученная суспензионная культура *S. baicalensis* имеет удовлетворительные ростовые свойства и характеризуется достаточным уровнем жизнеспособности, что позволяет говорить о перспективности введения шлемника в среду *in vitro*.

ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГИПЕРСПЕКТРАЛЬНОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ИШЕМИЗАЦИИ КИШЕЧНИКА

Шуплецов В.В.¹, Горюнов И.А.¹, Адаменков Н.А.², Дрёмин В.В.^{1,3}

¹ФГБОУ ВО Научно-технологический центр биомедицинской фотоники ОГУ
им. И.С. Тургенева, Орел, Россия;

²БУЗ Орловской области «БСМП им. Н.А. Семашко», Орел, Россия;

³Колледж инженерных и физических наук, Астонский университет,
Бирмингем, Великобритания

valery.shupletsov@bmecenter.ru

Кишечная ишемия возникает в результате различных нарушений, вызывающих недостаточный приток крови к кишечнику. Тип и прогноз такого повреждения зависит от множества факторов, в том числе и от того, насколько своевременно проведена соответствующая диагностика. В этой связи разработка новых методов оценки жизнеспособности тканей во время хирургического вмешательства является перспективным направлением развития современной биомедицинской инженерии. В данной работе изучаются возможности применения технологии гиперспектральной визуализации для анализа ишемии тканей кишечника лабораторной крысы при моделировании локальной ишемии.

Объектом исследования являлась здоровая половозрелая лабораторная крыса линии Wistar (самец). Разработанный метод оптической визуализации был основан на регистрации диффузного отражения света от тканей с применением гиперспектрального подхода, который позволяет получать пространственное распределение спектральной информации. В качестве широкополосного источника излучения использовался разработанный галогенный источник, в качестве детектора – гиперспектральная камера Specim (Spectral Imaging Ltd., Финляндия) со спектральным диапазоном 400-1000 нм.

В соответствии с протоколом исследования производилась срединная лапаротомия области живота лабораторной крысы с последующим выделением тонкой кишки из брюшной



полости с брыжейкой. Затем осуществлялось наложение лигатуры на аркадные сосуды кишки 3 капроновыми нитями через каждые 10 см и погружение кишечника обратно в брюшную полость. Измерения окклюзированного кишечника проходили через 1 и 12 часов после наложения лигатуры соответственно. Были получены гиперспектральные массивы изображений тонкой кишки. Для нормализации измеренных данных производилась регистрация спектров от эталона диффузного отражения.

Далее, основываясь на различном поглощении света несвязанной и связанной с кислородом формами гемоглобина, был рассчитан параметр тканевой сатурации с использованием двухволнового подхода для ближней инфракрасной области. Выявленная разница в рассчитанных показателях сатурации для окклюзированных областей по каждому этапу измерения свидетельствует о возможности применения гиперспектральной визуализации для оценки степени ишемизации кишечника.

ПРЯМОЕ И МЕДИАТОРНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ КИСЛОРОДА В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЛАККАЗЫ М-13, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ МЕТОДОМ КОВАЛЕНТНОГО СВЯЗЫВАНИЯ

Якимович С.В.

ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия

sonya.yakimovich@mail.ru

При разработке биосенсоров для детекции фенольных соединений и эффективных биокатодов в биотопливных элементах используют фермент лакказы (КФ 1.10.3.2, пара-дифенол: кислород оксидоредуктаза). Важную роль в биосенсорах на основе лакказы играет способ иммобилизации фермента на поверхность рабочего электрода. Ковалентное связывание фермента с поверхностью электрода обеспечивает высокую стабильность биоэлектродов и возможность их повторного использования.

Объектом исследования является двухдоменная бактериальная лакказа М-13, полученная сайт-направленным мутагенезом высокоактивной лакказы из актинобактерии *Streptomyces carpinensis* ВКМ Ас-1300. Фермент предоставлен для исследований к.б.н. Трубициной Л.И. (Пушкинский центр биологических исследований РАН). В качестве рабочего электрода использовали грифели карандашей фирмы Bruno Visconti Graphix (твёрдость НВ, диаметр 2,0 мм), модифицированные окисленными многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ_{ок}) серии «Таунит-М» (ООО «НаноТехЦентр»). Часть электродов стабилизировали путем формирования белковой пленки бычьего сывороточного альбумина в присутствии глутарового альдегида. Электрохимические измерения проводили в ячейке (4 мл) в Na-ацетатном буфере (рН=5,0) при помощи гальванопотенциостата «РС-micro». Зависимость силы тока электрода от времени регистрировали при постоянных потенциалах +170 и +270 мВ. Ячейку продували аргоном для удаления кислорода, по достижению постоянного тока насыщали ячейку кислородом. Затем вводили 50 мкл 1 мМ АБТС (2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)) для регистрации общей лакказной активности на электроде.



На полученных амперограммах при постоянном потенциале +170 мВ для грифелей, модифицированных МУНТ_{ок}, как в присутствии, так и в отсутствии белковой пленки, при насыщении ячейки аргоном наблюдается уменьшение тока восстановления. При поступлении кислорода в ячейку (включение мешалки) увеличиваются токи восстановления. Полученные результаты свидетельствуют об участии правильно ориентированных молекул лакказы в прямом переносе электронов от Т1-центра фермента на кислород. При добавлении в ячейку АБТС ток восстановления скачкообразно увеличивается благодаря медиаторному переносу электронов (МПЭ) независимо от ориентации молекул фермента. При потенциале +270 мВ (относительно хлорсеребряного электрода) ток восстановления кислорода зарегистрировать не удалось, наблюдался лишь МПЭ.

Таким образом можно предположить, что окислительно-восстановительный потенциал Т1-центра лакказы М-13 находится в области +370 – +400 мВ (относительно водородного электрода) и ниже +450 – +470 мВ.



ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОМЕДИЦИНА

ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕДЕНЧЕСКОГО ФЕНОТИПА В СТОРОНУ ПСИХОПАТОЛОГИИ У КРЫС ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ ПЕРЕМЕННОГО УЛЬТРАЗВУКА

Абрамова О.В.^{1,2}, Морозова А.Ю.², Зубков Е.А.¹, Зоркина Я.А.^{1,2}, Ушакова В.М.^{1,2}

¹ФГБУ НМИЦ ПН им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва, Россия;

²ГБУЗ Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева, Москва, Россия

abramova1128@gmail.com

Психические расстройства имеют сложную многофакторную этиологию, и механизмы их возникновения и развития до конца не изучены. Одним из перспективных методов изучения психических расстройств является использование моделей на животных. Животные, подвергшиеся воздействию пренатального стресса (ПС), подходят в качестве моделей психических расстройств, поскольку материнский стресс во время беременности влияет на развитие головного мозга эмбриона.

В предыдущих исследованиях нами было показано, что воздействие ультразвуком переменной частоты (пУЗ) на взрослых крыс является стрессовым. Целью данного исследования было изучить влияние пренатального действия пУЗ на поведение крыс, а также определить возможность создания модели психического расстройства на основе этого воздействия. В эксперименте использовались крысы линии Вистар. Самки из экспериментальной группы в течение всего периода беременности находились под воздействием пУЗ. Беременные самки из контрольной группы содержались в нормальных условиях. Поведение родившегося потомства изучалось при помощи поведенческих тестов: открытое поле, игровое поведение, социальное взаимодействие, распознавание объектов, латентное торможение.

Анализ результатов показал статистически значимые различия во всех тестах. Результаты нашего исследования показали негативное влияние ПС, вызванного пУЗ, на поведение потомства крыс: усиление тревожного поведения и снижение локомоторной активности в тесте открытое поле; нарушение социального поведения в тестах на игровое поведение и социальное взаимодействие; снижение когнитивных функций в тесте на распознавание объекта; нарушение латентного торможения у животных с ПС, по сравнению с контрольным потомством, у которого наблюдалось нормальное латентное торможение.

Таким образом, хроническое воздействие пУЗ на самку во время беременности вызывает у потомства поведенческие изменения, сходные с теми, которые наблюдаются при использовании традиционных способов стресса беременных самок крыс, поэтому данный метод может быть использован при изучении действия хронического ПС. Также полученные результаты важны для понимания этиологических факторов психоневрологических заболеваний у человека. Стресс во время беременности у людей также влияет на развитие плода и может быть причиной психических расстройств. Кроме того, известно, что ПС используется для получения моделей психических расстройств, поэтому мы предположили, что ПС, вызванный пУЗ, можно использовать с этой целью.



СОДЕРЖАНИЕ ПОЛОВЫХ И ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В КРОВИ
ВЫСОКОУДОЙНЫХ КОРОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СУПЕРОВУЛЯТОРНОГО ОТВЕТА
ЯИЧНИКОВ НА ГОРМОНАЛЬНУЮ СТИМУЛЯЦИЮ

Алейникова О.В., Ермилова А.П., Митяшова О.С., Лебедева И.Ю.

ФГБНУ ФИЦ животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста, Дубровицы, Россия

68ovk@mail.ru

Трансплантация эмбрионов, полученных от наиболее ценных особей, служит одним из основных биотехнологических методов, применяемых для генетического прогресса в молочном животноводстве. Однако гормональная стимуляция яичников крупного рогатого скота с целью индукции суперовуляторной реакции характеризуется высокой изменчивостью овариального ответа, в основе которого лежат индивидуальные особенности физиологического состояния животного, включая его собственный эндокринный статус. При этом вопрос о роли эндогенных гормональных факторов в формировании суперовуляторной реакции яичников требует дальнейшего прояснения.

В представленной работе нами исследовано содержание половых и тиреоидных гормонов в крови высокопродуктивных молочных коров при разном суперовуляторном ответе яичников на гормональную обработку. Было проанализировано 34 цикла стимуляции суперовуляции у 16 коров голштинской породы. После предварительной синхронизации полового цикла с помощью эстрофана («Биовета», Чехия) животных обрабатывали с использованием препарата Плюсет («Laboratorios Calier», Испания). В день осеменения и на 7 день после осеменения у коров брали кровь для анализа гормонов методом ИФА. Суперовуляторный ответ яичников оценивали по числу желтых тел, выявленных с помощью УЗИ на 7 день, и разделили на 2 типа: I – сильный (более 6 желтых тел; $n = 20$) и II – слабый (от 0 до 6 желтых тел; $n = 14$).

Обнаружено, что через 1 неделю после осеменения концентрация прогестерона у коров с сильным суперовуляторным ответом была в 1,9 раза выше ($P < 0,05$), чем у коров со слабым ответом, тогда как концентрация эстрадиола-17 β не различалась. Перед осеменением содержание общего трийодтиронина (Т3) в крови особей с I типом ответа было в 1,2 раза выше ($P < 0,05$), чем у особей со II типом. В то же время через 7 дней у коров с большим числом желтых тел была выявлена более высокая концентрация общего тироксина (Т4) и более низкая концентрация реверсивного Т3 (rТ3; в 1,1 раза, $P < 0,05$), чем у коров с их меньшим числом. При этом соотношение Т3/rТ3 у коров со слабым суперовуляторным ответом в день 0 и в день 7 было в 1,3 раза ниже ($P < 0,05$), чем у коров с сильным ответом. В целом, результаты исследований указывают на более высокую активность тиреоидной системы как в день осеменения, так и через 1 неделю у коров с сильным суперовуляторным ответом яичников по сравнению с животными со слабым ответом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-316-90054 Аспиранты).



ТИРОЗИНГИДРОКСИЛАЗА В ПЕРИОД ГИБЕЛИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА НА МЫШАХ

Алекперова Л., Колачева А.А.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

al.alekperova@gmail.com

Ключевым элементов патогенеза болезни Паркинсона (БП) является гибель дофаминергических нейронов (ДА-нейронов) нигростриатной системы. Активация компенсаторных процессов мозга в течение десятилетий маскирует постепенную деградацию этой системы. Одним из таких механизмов может быть увеличение синтеза дофамина (ДА) в еще не погибших ДА-нейронах. Цель исследования – оценка синтеза ДА в ДА-нейронах в период нейродегенерации нигростриатной системы при моделировании БП у мышей.

Модель БП воспроизводили четырехкратным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП), специфического токсина ДА-нейронов, с интервалом 2 ч в дозе 12 мг/кг. В стриатуме в интервале от 3х до 24 ч после последней инъекции МФТП оценивали: а) активность тирозингидроксилазы (ТГ) по концентрации L-ДОФА при ингибировании второго фермента синтеза ДА с помощью NSD-1015 (ВЭЖХ с ЭД); б) содержание ТГ и ее фосфорилированных форм по серину (P19, P31, P40) (Вестерн блот).

Ранее было показано, что количество терминалей ДА-аксонов в стриатуме постепенно снижалось до 60% к 6 ч после последней инъекции МФТП без дальнейших изменений, а концентрация ДА составляла 10% на всем периоде исследования. Содержание ТГ, скорость-лимитирующего фермента синтеза ДА, не менялось до 6 ч, но снижалось до 58% к 24 ч что свидетельствует о ретроградной деградации аксонов ДА-нейронов.

Активность ТГ была снижена на 95% в течение 6 ч после последней инъекции МФТП, что, вероятно, и является причиной значительной потери концентрации ДА в стриатуме. При этом содержание ТГ-P31, ключевой формы фермента определяющей активность ТГ, составляло соответственно 28% и 21% от контроля через 3 и 6 ч. Уровень ТГ-P40 через 3 ч не менялся, а к 6 снижался до 76%. ТГ-P19, форма фермента, способствующая фосфорилированию в других положениях белка, была в равной степени снижена на 65% в этот период. К 24 ч происходило частичное восстановление активности ТГ до 30% и увеличением только ТГ-P19 до 50%, но не других форм белка, что, однако, не привело к увеличению уровня ДА в стриатуме.

Таким образом, показано отсутствие корреляции между содержанием и активностью ТГ, а также концентрацией ДА в стриатуме при развитии нейродегенерации нигростриатной системы. Снижение активности фермента связано с уменьшением содержания ТГ-P31 формы и частично с ТГ-P19. Это делает их потенциальными мишенями для разработки фармакотерапии, направленной на восстановление уровня ДА в стриатуме при БП.

Работа поддержана грантом РФ (проект № 20-75-00110).



ВЫЗВАННАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИГЕМИНАЛЬНОГО НЕРВА В МЕНИНГЕАЛЬНОЙ ОБОЛОЧКЕ КРЫСЫ

Ананьев А.С.¹, Телина Э.Н.², Гафуров О.Ш.¹

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия;

²ФГАОУ ВО Казанский Государственный Медицинский Университет, Казань, Россия

anton990124@mail.ru

Мигрень – распространенное заболевание и является одной из причин временной нетрудоспособности людей по всему миру. Это заболевание характеризуется сложным патогенезом, включающим в себя тошноту, рвоту, чувствительность к свету и др. Современные исследования устанавливают связь мигрени с такими факторами, как генетическая предрасположенность, анатомические и физиологические особенности организма, воздействие фармакологических препаратов.

Одним из основных маркеров мигрени является кальцитонин-ген-связанный пептид (CGRP), который выделяется в менингеальных оболочках и вызывает повышение активности нервных волокон, иннервирующих сосуды тригеминальной области. Однако, в настоящий момент нельзя точно сказать, волокна какого типа играют главную роль в процессе формирования мигрени.

Цель данного исследования – определить тип волокон тройничного нерва в менингеальной оболочке крысы.

Для определения типа нервного волокна довольно часто применяется метод измерения скорости распространения потенциала действия (ПД). В данной работе для определения скорости проведения ПД мы использовали биполярную стимуляцию афферентных волокон тройничного нерва крысы на препарате «половинка черепа». Регистрация проводилась с помощью полого стеклянного электрода путем помещения внутрь дистальной части пересеченного нерва. Стимуляция биполярным электродом на определенном расстоянии от места регистрации позволила оценить скорость проведения ПД по нервным волокнам и, соответственно, выявить типы волокон, участвующих в ноцицептивной активности.

В результате проведения эксперимента со стимуляций в 20 различных точках препарата на площади 6 на 18 мм были зарегистрированы вызванные ПД в 6 точках. Места стимуляции, в которых возникали вызванные ПД, располагались на расстоянии 5-15 мм от регистрирующего электрода по ходу нерва. Временная задержка от стимула до регистрируемого вызванного ПД составила 1-13 мсек. Расчетная скорость распространения ПД варьировала от 0.7 до 8.3 м/с, что позволило отнести данные волокна к Аδ и С-типу. В двух точках стимуляции было зарегистрировано несколько вызванных ПД, распространяющихся с разной скоростью и относящихся к разным типам волокон. Это может свидетельствовать о тесном переплетении и возможном взаимодействии разных типов волокон.

Таким образом, биполярная стимуляция дает возможность определить типы волокон тройничного нерва, активируемых в менингеальной оболочке крысы.



РАЗРАБОТКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО НАПИТКА ДЛЯ ЛИЦ, СТРАДАЮЩИХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Андреев М.А.

ГБОУ Лицей 554, Санкт-Петербург, Россия

makariy.andreev2@gmail.com

Артериальная гипертензия (АГ) – это хроническое заболевание, для которого характерно длительное стойкое повышение артериального давления. При начальной стадии заболевания используются немедикаментозные методы: ограничение потребления поваренной соли (до 5 г/сутки); умеренные физические нагрузки; отказ от вредных привычек; диета, обогащенная витаминами и минералами.

В последнее время наблюдается повышенный спрос на функциональные продукты питания (ФПП) – продукты, которые кроме вкусовых качеств и пищевой ценности имеют физиологическое воздействие на организм человека.

Были рассмотрены имеющиеся пути лечения и профилактики АГ, а также предлагаемые диетические подходы для профилактики заболевания. Выяснив, недостаток каких биологически активных компонентов преобладает у гипертоников, мы приняли решение разработать ФПП. Такой продукт питания при систематическом ежедневном употреблении может восполнять недостающие минеральные элементы и витамины у людей, страдающих АГ. Витамины, которые необходимы в первую очередь для ежедневного употребления гипертониками: С, А, В1, В2, В3, В6, В12, D, Е, Р. Кроме того, гипертонику рекомендуется ежедневное потребление минеральных элементов (магний, калий, натрий, фосфор, кальций) с целью восполнения их недостатка, формирующегося на фоне медикаментозной терапии заболевания. Одним из самых важных является магний, восполнение недостатка которого в организме крайне необходимо, этот элемент укрепляет сердечную мышцу, стабилизирует обменные процессы, повышает эластичность сосудов и способствует стабилизации артериального давления.

Были отобраны компоненты, обогащенные необходимыми витаминами и минералами, для создания функционального напитка. Компоненты были выбраны в соответствии с содержанием в них необходимых для гипертоников биологически активных соединений (витамины, минералы), а также с учетом суточных норм потребления. Подбор соотношения выбранных нами компонентов для функционального напитка производился в соответствии с суточными нормами и органолептическими свойствами. Были определены органолептические показатели полученного функционального напитка, а в ходе дегустации на 20 добровольцах было выбрано оптимальное соотношение напитка по вкусовым показателям (вкус апельсина, вкус сельдерея, горечь, слабость, кислотность, соленость, послевкусие, гармоничность).

Результаты были обработаны профильным методом, на основании которого было выбрано оптимальное соотношение напитка: 3:1:1 (сок апельсина: сок сельдерея: вода).



ВЛИЯНИЕ ГИПОФУНКЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА ЛОКОМОТОРНУЮ АКТИВНОСТЬ КРЫС

Артемова В.С.^{1,2}, Назаров И.Р.^{1,2}, Пестерева Н.С.¹, Трактиров Д.С.¹

¹ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

lerochek1999@gmail.com

Дофамин – нейромедиатор, задействованный в регуляции физиологических функций: движение, когнитивные и исполнительные функции; системы вознаграждения и мотивации; нейроэндокринный контроль. Дисрегуляция дофаминергической системы наблюдается при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона, синдром дефицита внимания и гиперактивности, аддикции и шизофрения. Гипофункция дофаминергической системы, по данным литературы, приводит к снижению локомоторной активности в целом. Целью данного исследования было изучить влияние гипофункции дофаминергической системы на локомоторную активность крыс.

Материалы и методы. Данный эксперимент состоял из двух частей. Для первой части были отобраны 10 крыс самцов линии Вистар, разделенных на 2 группы: контрольную (n=5), которая получала 1,32% ледяную уксусную кислоту (ЛУК), и опытную, которой вводили альфа-Метил-L-тирозин (АМЛТ), растворенный в 1,32% ЛУК (100 мкг/кг, n=5); АМЛТ – конкурентный ингибитор тирозингидроксилазы, блокирующий метаболизм тирозина в Л-ДОФА. Для второй части использовались две группы крыс Вистар: контрольная – вводили 1,32% ЛУК (4 дня, n=5) и опытная – вводили резерпин, растворенный в 1,32% ЛУК (1 мг/кг, 4 дня, n=5). Резерпин блокирует загрузку дофамина в везикулы, что приводит к истощению его запасов. Проводились поведенческие тесты: “Сужающаяся дорожка”, “Открытое поле”. Все результаты представлены как отношение опыта к контролю (и наоборот) ± ошибка частного ($m \pm SEM$), использовался t-критерий Стьюдента.

Результаты. После введения АМЛТ не наблюдалось выраженного сенсомоторного дефицита по результатам теста “Сужающаяся дорожка”. Однако в тесте “Открытое поле” среднее количество исследованных норок ниже в $1,67 \pm 0,49$ раз, $p \leq 0,05$ для опытной группы относительно контрольной; стоек с упором меньше в $3,60 \pm 0,30$ раз, $p \leq 0,05$; обнюхиваний ниже в $2,11 \pm 0,39$ раз, $p \leq 0,05$; локомоций меньше в $2,14 \pm 0,30$, $p \leq 0,05$. При введении резерпина количество ошибок в тесте “Сужающаяся дорожка” увеличилось в $1,50 \pm 0,14$ раза для опытной группы, $p \leq 0,05$. По результатам теста “Открытое поле” среднее кол-во стоек с упором у контрольной группы составило 4,80 шт, у экспериментальной группы – 0 шт; среднее кол-во исследованных норок меньше в $5,10 \pm 0,37$ раз, $p \leq 0,05$; локомоций меньше в $11,40 \pm 11,14$ раз, $p \leq 0,05$.

Выводы. Таким образом, при гипофункции дофаминергической системы наблюдаются видимые изменения в поведении крыс – выраженный сенсомоторный дефицит, что подтверждается результатами поведенческого тестирования.



РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЛЕЧЕНИЯ ВЕНТРАЛЬНОЙ ГРЫЖИ С ПРИМЕНЕНИЕМ АЦЕЛЛЮЛЯРНОГО ДЕРМАЛЬНОГО МАТРИКСА

Асякина А.С.^{1,2}, Супрун И.В.^{1,2}, Карташевский И.И.¹, Мелконян К.И.¹

¹ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России,
Краснодар, Россия;

²ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

cnil.ksma@yandex.ru

Несмотря на совершенствование хирургической техники и использование современных шовных материалов, 10% лапаротомий осложняются образованием грыж, а в группах риска частота их возникновения достигает 31%. Хирургическое лечение послеоперационных вентральных грыж в настоящее время представляется актуальным, особенно в отношении больших и гигантских послеоперационных вентральных грыж, которые образовались вследствие обширного дефекта мышечно-апоневротического каркаса и брюшины. Применение синтетических имплантов приводит к развитию послеоперационных осложнений, хроническим болям и дискомфорту, в связи с этим нами был разработан хирургический имплант на основе ацеллюлярной дермы свиньи.

Цель данного исследования – оценка тканевой реакции на ацеллюлярный дермальный матрикс у экспериментальных животных в отдаленные сроки после герниопластики.

Герниопластика была проведена свинье–грыженосителю породы Ландрас (возраст 4 месяца), закрытие грыжевого дефекта осуществлялось методом ненатяжной предбрюшинной герниопластики передней брюшной стенки (методом sublay) с помощью ацеллюлярной свиной дермы (10см x 8см x 0,05см). На 60-й день после пластики грыжи проводили биопсию образцов из области примыкания белой линии живота к имплантированному бесклеточному матриксу и из области послеоперационного рубца для оценки степени биодеградации, иммуногенности и прочности ацеллюлярного дермального матрикса соответственно.

Ткани из области имплантации бесклеточной дермы демонстрировали развитие зрелой соединительной ткани с большим количеством коллагеновых и эластических волокон на фоне полного отсутствия признаков воспаления. Вокруг шовного материала сформировалась типичная гранулёма инородного тела, в то время как имплантированный ацеллюлярный матрикс не имел соединительнотканной капсулы. Результаты иммуногистохимической реакции показали присутствие большого количества коллагена I типа в образцах из области послеоперационного рубца, а также значительную часть клеток мезенхимного происхождения – в частности, фибробластов и эндотелиоцитов, которые формируют типичный пейзаж рубца.

Исходя из результатов гистологического исследования, можно сделать вывод о прочности бесклеточного матрикса, использованного для закрытия грыжевого дефекта, что подтверждается состоятельностью рубца. Кроме того, отсутствие воспалительных изменений и соединительнотканной капсулы вокруг матрикса говорит в пользу его низкой иммуногенности.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00199.



КОМПЕНСАТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПРИ ПРОГРЕССИРУЮЩЕЙ ДЕГРАДАЦИИ НИГРОСТРИАТНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОМ МОДЕЛИРОВАНИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА У МЫШЕЙ

**Банникова А.Е., Колачева А.А., Павлова Е.Н., Богданов В.В., Блохин В.Е.,
Ким А.Р., Угрюмов М.В.**

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

alyona8annikova@yandex.ru

По мере прогрессирования деградации nigrostriatной системы мозга при болезни Паркинсона (БП) происходит развитие компенсаторных механизмов, направленных на поддержание нормального уровня дофамина (ДА) в стриатуме. Изучение нейрокомпенсации на доклинической и клинической стадиях возможно только на моделях БП на животных. Целью данной работы явилась разработка субхронической модели БП на мышах с прогрессирующей деградацией nigrostriatной системы с последующим анализом компенсаторных механизмов на уровне экспрессии генов.

Мыши C57Bl/6 раз в сутки получали 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в нарастающих дозах 8, 10, 12, 16, 20, 26, 40 мг/кг. 1. Оценку прогрессирующей дегенерации ДА-нейронов проводили по уровню ДА в стриатуме и черной субстанции (ЧС) (ВЭЖХ-ЭД), а также по количеству ДА-нейронов (ИГХ) в ЧС через 24ч после каждой инъекции МФТП. 2. Через 4 дня после МФТП по схемам 8, 8-16 и 8-40 мг/кг определяли двигательную активность мышей (открытое поле), а через 5 дней: уровень ДА в стриатуме, количество ДА-нейронов и экспрессию 112 генов (ПЦР-Open array) в ЧС.

Концентрация ДА в стриатуме постепенно снижалась до 30% после нарастающих доз МФТП 8-12 мг/кг. После последней дозы МФТП 40 мг/кг уровень ДА составлял 25%. Количество ДА-нейронов и содержание ДА в ЧС начинали снижаться только после дозы МФТП 16 мг/кг.

Нарушение двигательной активности мышей было после последней инъекции МФТП 40 мг/кг, уровень ДА и количество ДА-нейронов подтвердил пороговую деградацию nigrostriatной системы. На доклинических стадиях (8 и 8-16 мг/кг МФТП) показано снижение мРНК белков, участвующих в деградации катехоламинов и белков, везикулярном транспорте, антиоксидантной системе и про-апоптотическом сигналинге. На клинической стадии (8-40 мг/кг МФТП) обнаружены противоположные изменения уровня мРНК.

Разработанная модель прогрессирующей деградации nigrostriatной системы с изучением компенсаторных механизмов позволит найти новые мишени для фармакотерапии.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Контракт в системе электронный бюджет № 075-15-2020-795, Соглашение № 13.1902.21.0027 от 29.09.2020).



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Басович Л.С.¹, Костина Д.А.², Карелкин В.В.³, Успенский В.Е.⁴, Малашичева А.Б.²

¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Р.Р. Вредена Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

miloverova@yandex.ru

Остеогенная дифференцировка клеток является основой образования костной ткани. В то же время патологическая остеогенная дифференцировка может приводить к патологиям сердечно-сосудистой системы таким, как, например, кальцинированный стеноз аортального клапана. Вопрос о том, почему возникают очаги патологической остеогенной дифференцировки, остается открытым, а механизмы инициации такой дифференцировки слабо понятными. Задачей данной работы было сравнить остеогенную дифференцировку нормальных остеобластов человека и интерстициальных клеток аортального клапана пациентов с аортальным стенозом.

Первичные культуры остеобластов человека получали из фрагмента бедренной кости пациентов, проходящих операционное лечение в НИИТО им. Вредена; первичные культуры интерстициальных клеток аортального клапана получали из фрагментов аортального клапана пациентов с кальцинирующим аортальным стенозом НМИЦ им. В.А. Алмазова. Клетки культивировали 3-5 пассажей и индуцировали остеогенную дифференцировку при помощи добавления в среду классического коктейля остеогенных факторов – дексаметазона, глицерофосфата кальция и аскорбиновой кислоты. На 7 сутки из клеток, в которых была индуцирована остеогенная дифференцировка, и из контрольных выделяли РНК для последующего анализа методом количественной ПЦР. По истечении 21 дня культуры тех же клеток окрашивали ализариновым красным для выявления центров связывания красителя с кристаллами фосфата кальция и оценки эффективности остеогенной дифференцировки.

Анализ экспрессии генов RUNX2, OPN и COL1A методом количественной ПЦР выявил значительно большее содержание проosteогенного гена RUNX2 в остеобластах по сравнению с интерстициальными клетками. При индукции дифференцировки содержание гена RUNX2 значительно увеличивалось и в остеобластах, и в интерстициальных клетках аортального клапана по сравнению с уровнем этого гена в недифференцированных клетках; уровень генов OPN и COL1A незначительно возрастал в обоих типах клеток при индукции остеогенной дифференцировки.

По уровню окраски ализарином после остеогенной дифференцировки остеобласты почти не отличались от интерстициальных клеток аортального клапана.

Мы полагаем, что уровень гена RUNX2 может определять ключевые тканеспецифические различия в клетках в норме и при патологии.

Исследование выполняется при финансовой поддержке гранта РФФИ, № 18-14-00152п



ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МУТАЦИЙ ТРОПОМИОЗИНА, АССОЦИИРОВАННЫХ С
НЕКОМПАКТНЫМИ КАРДИОМИОПАТИЯМИ, НА АКТИН-МИОЗИНОВОЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В МИОКАРДЕ

**Бельдия Е.А.^{1,2}, Кочурова А.М.¹, Гильмуллина К.А.^{1,2}, Матюшенко А.М.³,
Копылова Г.В.¹, Щепкин Д.В.¹**

¹ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН,
Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

³ФГУ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

zgupkabeldya@gmail.com

Недавно показано, что регуляторный белок тропомиозин (Трм) принимает участие в развитии камер сердца, а именно в «созревании» миокарда желудочков, то есть в уплотнении волокон, сужении межтрабекулярных лакун и развитии межпредсердной перегородки [McKeown et al., Dev. Dyn., 2014]. Обнаружены мутации в гене ТРМ1, кодирующем сердечную изоформу Трм1.1, ассоциированные с некомпактной кардиомиопатией левого желудочка (НМЛЖ) и врождёнными пороками сердца (ВПС) [Chang et al., Mol. Genet. Metab., 2011; England et al., J. Mol. Cell Cardiol., 2017]. Целью работы было исследование молекулярного механизма влияния мутаций I130V и D159N Трм, ассоциированных с НМЛЖ и ВПС, на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде.

Для этого мы использовали изолированные сократительные белки в *in vitro* подвижной системе (ИПС). Миозин экстрагировали из левого предсердия и желудочка барана. Миозин предсердий содержал преимущественно альфа-изоформу тяжелых цепей миозина и лёгкие цепи предсердного типа, миозин желудочков – бета-изоформу тяжелых цепей и лёгкие цепи желудочкового типа. Актин выделяли из скелетных мышц кролика, тропонин – из левого желудочка быка. Человеческий Трм1.1 дикого типа (WT) и Трм1.1 с мутациями I130V и D159N экспрессировали в *E.coli*. Мы проанализировали Ca²⁺ зависимость скорости скольжения тонких филаментов, реконструированных из актина, тропонина и Трм (зависимость *p*Ca-скорость), по миозину в ИПС.

Обнаружено, что мутации Трм по-разному влияют на характеристики зависимости *p*Ca-скорость миозина желудочков и предсердий. Мутация D159N снижала скорость скольжения филаментов при насыщающей концентрации Ca²⁺ по миозину желудочков. С миозином предсердий мутация D159N уменьшала, а мутация I130V увеличивала максимальную скорость филаментов, и обе мутации уменьшали Ca²⁺ чувствительность зависимости *p*Ca-скорость.

Таким образом, функциональные нарушения миокарда, связанные с наличием исследованных мутаций тропомиозина, могут быть вызваны изменением характеристик кальциевой регуляции актин-миозинового взаимодействия в желудочках и предсердиях.

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН, поддержано РФФИ № 20-04-00130 и Программой 122022200089-4.



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ РАЗРАБОТКА РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА НА ОСНОВЕ ПРОВОКАЦИОННОГО ТЕСТА

**Богданов В.В.¹, Ким А.Р.¹, Павлова Е.Н.¹, Колачева А.А.¹, Дильмухаметова Л.К.¹,
Блохин В.Е.¹, Валувев Л.И.², Валувев И.Л.², Горшкова М.Ю.², Угрюмов М.В.¹**

¹ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

²ФГБУН Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, Россия

vse-bogd@yandex.ru

Распространение нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона (БП), является глобальным вызовом XXI века. При БП происходит гибель дофаминергических нейронов nigrostriатной системы мозга. Клинические симптомы БП (ригидность мышц, брадикинезия, тремор) появляются при гибели 50% этих нейронов и падении уровня дофамина в стриатуме на 70%. До этого момента нейродегенерация длительное время протекает бессимптомно. Лечение БП сводится к фармакологической компенсации дефицита дофамина в nigrostriатной системе, а на поздних стадиях заболевания – к паллиативной помощи. Поэтому разработка ранней диагностики БП является актуальной проблемой.

В терапии распространена диагностика бессимптомного течения хронических заболеваний при помощи провокационных тестов. Такой тест направлен на усиление функциональной недостаточности патологически измененного органа, что ведет к кратковременному проявлению специфических симптомов заболевания. Несмотря на широкое применение этого подхода в терапии, нами он был впервые применен в неврологии.

Целью работы была разработка провокационного теста для диагностики БП на доклинической стадии. В качестве провокационного агента нами был использован метиловый эфир альфа-метил-пара-тирозина (α МПТ). Он является ингибитором тирозингидроксилазы – ключевого фермента синтеза дофамина, вызывая обратимое кратковременное снижение уровня дофамина в тканях.

Чтобы обеспечить локальное воздействие α МПТ на мозг, был выбран интраназальный способ его введения в геле-носителе, обеспечивающем удержание и абсорбцию α МПТ на обонятельном эпителии и перенос сквозь решетчатую кость вдоль черепно-мозговых нервов в головной мозг.

В первоначальных экспериментах на интактных мышах были изучены фармакокинетика и фармакодинамика α МПТ.

Дальнейшее испытание α МПТ как провокационного агента проводили на мышах с нейротоксической моделью доклинической стадии БП. На этой модели уровень дофамина в стриатуме был снижен на 60% относительно контрольной группы. Было показано, что введение α МПТ мышам с моделью БП приводит к дополнительному снижению уровня дофамина до 23% от контроля, что ниже порога проявления симптомов БП. При этом в тесте «открытое поле» наблюдали нарушение моторного поведения.

В контрольной группе введение α МПТ вызывало допороговое снижение дофамина в стриатуме, не приводящее к изменению моторного поведения. Следовательно, выбранные условия введения и дозировка α МПТ могут выявлять скрытую деградацию nigrostriатной системы.

Таким образом, нами разработан способ ранней диагностики БП путем интраназального введения ингибитора синтеза дофамина.



РОЛЬ ПАННЕКСИНА 1 В РЕГУЛЯЦИИ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ МЫШИ

Богоцкой К.А., Тарасова О.С.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

k.bogotskoy@gmail.com

Белки семейства паннексинов являются важным компонентом пуринергической системы, к многочисленным функциям которой относится регуляция тонуса сосудов. В сосудах головного мозга мыши обнаружено высокое содержание паннексина 1 (Panx1) в гладкомышечных и эндотелиальных клетках, что предполагает его участие в регуляции мозгового кровотока (МК). В связи с этим целью данной работы было изучить роль Panx1 в регуляции МК у мышей.

По причине отсутствия достаточно селективных блокаторов Panx1 в работе использовали нокаутную по гену Panx1 линию мышей (Panx1KO). Также использовали линию мышей с таргетированной заменой Arg217His, аналогичной описанной у человека мутации, которая предположительно приводит к нерабочему состоянию Panx1. Контролем служили мыши линии C57BL/6 (генетическая основа обеих генномодифицированных линий). Исследования проводили на наркотизированных (золетил + ксилазин по 17 мг/кг) самцах в возрасте от 8 до 10 недель. Линейную скорость кровотока в венах, расположенных на поверхности лобной и теменной зон коры, регистрировали с помощью метода лазерной (длина волны 780 нм) спекл-контрастной визуализации, затем с учетом внутреннего диаметра сосудов вычисляли объемный МК. Исследовали изменения МК при гиперкапнии (ингаляция газовой смесью с 5% или 10% CO₂ в течение 5 минут) в отсутствие фармакологических воздействий и в условиях ингибирования синтеза NO (L-NAME, 40 мг/кг).

При ингаляции 5% CO₂ прирост объемного МК у мышей Panx1KO был менее выражен, чем у мышей C57BL/6 (на 30%), тогда как у мышей Arg217His величина реакции не отличалась от реакции у дикого типа. При увеличении доли CO₂ до 10% реакция МК у всех групп многократно возрастала, а межгрупповые различия исчезали. Последующая блокада синтеза NO в равной степени уменьшала величину реакции МК в группах C57BL/6 и Arg217His (на 26-34% при 5% CO₂ и на 9-15% при 10% CO₂), но не влияла на величину реакции у Panx1KO.

Таким образом, реакция адаптивного повышения МК в ответ на гиперкапнию у мышей с нокаутом гена Panx1 уменьшена, а также не снижается при блокаде синтеза NO, в отличие от мышей C57BL/6. Это указывает на важную роль Panx1 в регуляции МК при гиперкапнии и его связь с механизмами, зависимыми от NO. Мыши с таргетированной заменой в гене Panx1 не воспроизводят фенотип Panx1KO. Механизмы взаимодействия Panx1 и NO-системы являются предметом дальнейших исследований.



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК

Брянская Е.О., Долгих А.И., Дунаев А.В., Винокуров А.Ю.

ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орёл, Россия

bryanskayae@mail.ru

ФАДН₂ является простетической группой флавопротеинов и участвует в таких важнейших процессах, как окисление жирных кислот, цикл Кребса, транспорт веществ. Кроме того, ФАД обладает способностью к автофлуоресценции (спектр возбуждения находится в диапазоне длин волн 350-500 нм, а спектр эмиссии в диапазоне 500-600 нм). Известно, что клетки с различными нарушениями в метаболизме характеризуются более высоким уровнем интенсивности ФАД в зелено-голубом спектре по сравнению со здоровыми. Выявление источника автофлуоресценции, вносящего наибольший вклад в общий сигнал ФАД в таких клетках позволит понять механизм развития патологических изменений.

Исследования были проведены на 20-дневной культуре контрольных фибробластов при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа ZEISS LSM 900 с системой Airyscan 2 (Carl Zeiss AG, Германия) на длине волны 488 нм.

С помощью красителя NucView 488 (Biotium, США) были выявлены клетки с апоптозом. При этом содержание апоптотических клеток среди клеток с низким уровнем автофлуоресценции составило 2,5%, с высоким уровнем – 4,4%. С помощью красителя йодид пропидия (Invitrogen, США) были выявлены клетки с некрозом. Получено, что содержание некротических клеток среди клеток с низким уровнем автофлуоресценции составляет 7,2%, с высоким уровнем – 0,9%. Данные результаты свидетельствуют о жизнеспособности клеток, обладающих высоким уровнем автофлуоресценции, но вероятно имеющих патологии в метаболизме, и необходимости определения, что обеспечивает данный уровень сигнала.

Для этого была оценена роль ФАД, являющегося коферментом МАО, в общем сигнале автофлуоресценции. После внесения 10 мкМ раствора адреналина регистрировали максимальное значение автофлуоресценции, при этом добавление 20 мкМ раствора селегилина вызывало падение сигнала. Согласно полученным данным, у клеток с высоким уровнем автофлуоресценции пул МАО составил $10,1\% \pm 2,1$ от общего сигнала автофлуоресценции, когда как у клеток с низким уровнем – $6,8\% \pm 0,9$.

Полученные данные говорят о жизнеспособности клеток с высоким уровнем автофлуоресценции в момент исследования, и возможности последующего предотвращения их патологического состояния, связанного с большим пулом МАО и более высоким уровнем экспрессии фермента.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1877.



ПОИСК БЕЛКОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА АНТИФИБРОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СЕКРЕТОМА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

**Бутузова Д.А., Кулебякина М.А., Басалова Н.А., Клычников О.И.,
Арбатский М.С., Ефименко А.Ю.**

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

butuzova_dasha@mail.ru

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) регулируют процессы обновления и восстановления тканей после повреждения посредством секреции биологически активных веществ, большинство из которых имеют белковую природу. В организме человека наиболее распространенным исходом заживления тканей является фиброз, ключевой клеточный механизм которого представлен миофибробластной дифференцировкой резидентных фибробластов. В ходе изучения секретома МСК в нашей лаборатории было обнаружено, что фракция секретома, содержащая ВВ и фракция, обогащенная растворимыми белковыми факторами (РФ), обладают антифибротической активностью *in vitro*, при этом тотальная фракция секретируемых МСК белков – цельная кондиционированная среда (КС) МСК – подобного эффекта не вызывает.

Целью данной работы было исследовать белковый состав представленных фракций секретома и, сравнив представленность белков в них, установить, какие из белков могут опосредовать анти- и про-фибротический эффект исследуемых фракций. В ходе экспериментов получали КС иммортализованных МСК жировой ткани человека (hTERT-ASC, ASC52telo, ATCC), методом ультрафильтрации из неё выделяли фракции ВВ и РФ. Из полученных фракций методом трипсинолиза в растворе готовили образцы пептидов, которые затем очищали и концентрировали с использованием колонок ZipTip (Merck Millipore). После этого проводили хроматографическое разделение с последующим масс-спектрометрическим анализом на приборе Q Exactive HF-X и биоинформатическую обработку данных в ПО MaxQuant и Perseus. Результаты масс-спектрометрического анализа верифицировали методом вестерн-блоттинга.

По результатам работы нами выявлено 19 белков, содержание которых во фракциях ВВ, РФ и КС коррелировало с их наблюдаемым *in vitro* антифибротическим действием. Эти белки могут обуславливать антифибротический эффект фракций ВВ и РФ. Также было идентифицировано 19 белков, предположительно, обладающих антифибротической активностью, поскольку их содержание во фракциях ВВ, РФ и КС обратно коррелировало с их антифибротическим действием.

В ходе дальнейшей работы планируется оценить вклад выявленных белков в реализацию антифибротического действия секретома МСК.



СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА РЕЗИДЕНТНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПОЧКИ С ВОЗРАСТОМ НА МОДЕЛИ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

**Буян М.И.¹, Андрианова Н.В.², Попков В.А.^{2,3}, Зорова Л.Д.^{2,3}, Певзнер И.Б.^{2,3},
Силачев Д.Н.^{2,3}, Зоров Д.Б.^{2,3}, Плотников Е.Ю.^{2,3}**

¹ФГБОУ ВО Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

²НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и
перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

marinanenart@gmail.com

Старение отрицательно влияет на многие функции организма. Почки в процессе старения также претерпевают множество изменений, ухудшающих работу этого органа и приводящих к повышению риска острого почечного повреждения у пожилых людей, а также его перехода в хроническую болезнь почек. Одной из возможных причин этого может быть уменьшение пула резидентных прогениторных клеток. Снижение количества и регенеративной способности резидентных стволовых клеток были показаны для некоторых других органов, однако, подобных исследований в отношении почек пока не было проведено.

В данной работе мы изучили изменение количества резидентных прогениторных клеток почки с возрастом и их пролиферативной активности. Эксперименты были проведены на молодых и старых трансгенных мышях, имеющих репортерный ген GFP под промотором гена нестина. В ряде органов, в том числе в почке, нестин считается одним из маркеров прогениторных клеток.

Мы проанализировали срезы почек трансгенных мышей и продемонстрировали, что нестин⁺ клетки локализовались, в основном, в предполагаемых нишах прогениторных клеток. При этом мы обнаружили, что количество нестин⁺ клеток значительно снижалось в почках старых трансгенных мышей по сравнению с молодыми. Были также проведены эксперименты *in vitro* на первичных культурах эпителия почечных канальцев (ЭПК), полученных от молодых и старых трансгенных мышей. Было выявлено, что культуры ЭПК от старых мышей пролиферировали значительно медленнее, чем культуры от молодых животных. Анализ накопления нестин⁺ клеток в культуре ЭПК от трансгенных мышей разного возраста показал, что у старых мышей этот процесс происходил значительно медленнее. Мы также исследовали влияние нефротоксического агента цисплатина на культуры ЭПК и показали, что культуры от старых мышей менее устойчивы к его повреждающему воздействию. Кроме того, мы обнаружили, что с возрастом происходит падение трансмембранного потенциала митохондрий в культурах ЭПК. Тем не менее, различия в митохондриальном потенциале между нестин⁺ и нестин⁻ клетками внутри каждой возрастной группы выявлено не было.

Таким образом, мы показали, что в почках с возрастом происходит многократное снижение количества резидентных прогениторных клеток и их пролиферативной активности. Данные возрастные изменения могут отрицательно влиять на устойчивость органа к повреждению, а также снижать его способность к регенерации.

Работа поддержана грантом РФФ 21-75-30009.



ВЛИЯНИЕ ПОВТОРНОГО ОПЫТА ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА НА ЭКСПРЕССИЮ СТРЕСС-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ КРОВИ У КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР

Валеева Е.В.^{1,2}, Кравцова О.А.¹

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия;

²ФГБОУ ВО Казанский государственный медицинский университет Минздрава России,
Казань, Россия

vevaleeva@ya.ru

Хронический стресс – это длительное воздействие неблагоприятных факторов, приводящие к гомеостатическому дисбалансу. Ответ на стресс опосредуется нейроэндокринной системой благодаря молекулярным взаимодействиям передачи сигналов от ЦНС к ПНС.

Цель работы – изучение воздействия хронического стресса на экспрессию стресс-чувствительных генов в клетках крови крыс самок и самцов линии Вистар.

Исследования были проведены на 54 самцах весом 256-316 г. и 34 самках с массой 202-266 г. Были сформированы 4 группы животных: I – интактные; II – крысы, подвергавшиеся вынужденному плаванию с грузом; III – крысы, подвергавшиеся иммобилизации; IV – крысы, подвергавшиеся комбинированной нагрузке из II и III группы. В начале, на 90, 180 и 270 день у крыс забирали венозную периферическую кровь из хвоста для выделения РНК (ExtractRNA, Евроген, РФ) и обратной транскрипции (MMLV RT kit, Евроген, РФ), с последующей оценкой экспрессии генов *Prlr*, *Slc6a4*, *Adra2c*, *Crh*, *Htr4*, *Creb1* и *Bdnf* методом qPCR в реальном времени (CFX96, США). Для расчета относительного уровня экспрессии генов методом $\Delta\Delta C_t$ использовался референсный ген *Gapdh*.

Все типы хронического стресса приводили к гиперэкспрессии гена *Slc6a4* на 180 день эксперимента и возвращались к исходному на 270 день вне зависимости от пола. Экспрессия гена *Htr4a* значимо снижалась в динамике у самцов, тогда как у самок к концу эксперимента экспрессия *Htr4a* повышалась. У самок на 180 день изменялась экспрессия *Adra2c* в группе крыс, подвергавшиеся иммобилизации и комбинированному воздействию, на 270 день сохранялся уровень в IV группе. Изменение экспрессии гена *Adra2c* наблюдалось только у самцов на 90 день воздействия комбинированных стрессоров и на 270 день повторной иммобилизации. Аналогично у самцов экспрессия гена *Crh* значимо изменялась на 270 день в группе, подвергавшиеся нагрузке и иммобилизации. У самцов в ответ на иммобилизацию и комбинированное воздействие стрессоров происходит снижение экспрессии *Bdnf* к концу эксперимента, тогда как пониженный уровень активности гена *Bdnf* наблюдался только у самок из II группы. Активация гена *Creb1* снижалась у самок и самцов на 180 день во всех экспериментальных группах, кроме контрольной. Сохранялась данная тенденция только у самок.

Таким образом, относительный уровень активности генов *Prlr*, *Slc6a4*, *Adra2c*, *Crh*, *Htr4*, *Creb1* и *Bdnf* в клетках крови может являться биомаркером для оценки степени воздействия хронического стресса.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 19-34-90171.



ИНГИБИРОВАНИЕ NIF1 ПРЕДОТВРАЩАЕТ СУПРЕССИЮ ПЕНТОЗОФОСФАТНОГО ПУТИ И АПОПТОЗ НЕЙРОНОВ В ГИППОКАМПЕ КРЫС В МОДЕЛИ ПОСТГИПОКСИЧЕСКОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Ветровой О.В.^{1,2}

¹ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

vov210292@yandex.ru

Пентозофосфатный путь (ПФП) метаболизма глюкозы представляет собой ключевой источник НАДФН в мозге. НАДФН является незаменимым субстратом ферментативных реакций, направленных на поддержание эффективной антиоксидантной защиты и предотвращение окислительного стресса. В работе на крысах линии Wistar нами показано, что тяжелая гипобарическая гипоксия (ТГ) и последующая реоксигенация, вызывающие краткосрочное увеличение количества регуляторной альфа субъединицы NIF1 (NIF1 α) в CA1 поле гиппокампа, индуцируют снижение количества и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и количества НАДФН, что сопровождается окислительным стрессом и запуском апоптоза. Инъекция ингибитора NIF1 топотекана перед ТГ предотвращает увеличение количества NIF1 α , снижает экспрессию маркера транскрипционной активности NIF1, эритропоэтина, нормализуя количество и активность Г6ФДГ и увеличивая уровень НАДФН, что сопровождается нормализацией окислительно-восстановительного статуса и снижением свободнорадикального окисления в гиппокампе, а также предотвращением апоптотических процессов и гибели нейронов. Кроме того, с применением модели умеренной гипобарической гипоксии *in vivo* выявлена обратная связь между активностью NIF1 и количеством мРНК Г6ФДГ. Универсальность открытого механизма NIF1-зависимой негативной регуляции экспрессии Г6ФДГ подтверждена в *in vitro* экспериментах на культуре клеток НЕК человека, трансфецированных люциферазой под NIF1-зависимым промотором. Полученные данные расширяют современные представления о механизмах постгипоксической патологии. Использование индукторов ПФП в ранний постинсультный период может быть рассмотрено в качестве потенциально эффективной стратегии коррекции постинсультных состояний в клинической практике.

Исследования осуществлены с использованием оборудования ресурсных центров «обсерватория экологической безопасности» и «развитие молекулярных и клеточных технологий» научного парка СПбГУ и Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ им. М.В. Ломоносова.



ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ФАРМАКОТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕМАНТИНА И LY379268 НА НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЮ В ГИППОКАМПЕ МОЗГА КРЫС

Гарджук А.А.¹, Першина Е.В.², Черноморец И.Ю.², Жуйкова Н.С.²

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

²ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Россия
anna.gardzhuk@mail.ru

Терапевтического подхода, способного остановить прогрессирующую нейродегенерацию, на сегодняшний день не существует, поэтому поиск новых нейропротекторов является актуальной задачей биомедицины.

Эксперименты проведены на самцах крыс Вистар $m = 200-220$ г; $n = 20$. Крыс случайным образом разделили на контрольную ($n = 5$) и три экспериментальных ($n = 15$) группы. Животным экспериментальных групп однократно внутрибрюшинно вводили нейротоксикант хлорид триметилолово (ТМТ) в дозе 7,5 мг/кг. Для подавления эксайтотоксичности животным двух экспериментальных групп ($n = 10$) вводили Memantine hydrochloride в дозе 10 мг/кг через 48 и 72 часа после инъекции ТМТ, при этом часть этих крыс ($n = 5$) подвергали дальнейшей терапии путем введения LY379268 в дозе 1 мг/кг на 5, 6, 7, 8 сутки после инъекции ТМТ. Оценку изменений когнитивных функций животных проводили в аппаратно-программном комплексе «Шелтер», где исследовали предпочтение пребывания животных в темном или светлом отсеках. На 14 день после инъекции ТМТ животных обучали реакции пассивного избегания и через 7 суток после обучения тестировали сохранность их памяти об электростимуляции в темном отсеке. Морфологическую оценку гибели нейронов в гиппокампе мозга крыс проводили с помощью окраски срезов мозга по Нисслю, а локализацию и активацию микроглиальных клеток методом флуоресцентного анализа тонких срезов мозга.

Результаты поведенческого тестирования выявили нарушение когнитивных функций у животных группы ТМТ, при сравнении с контрольной, в то время как использование модуляторов глутаматных рецепторов продемонстрировало достоверное увеличение времени нахождения животных в светлом отсеке при сравнении с группой ТМТ. Морфологические исследования выявили лизис пирамидных нейронов полей СА4-СА3 гиппокампа крыс группы ТМТ при сравнении с контрольной группой, в то время как фармакотерапия способствовала достоверному снижению гибели нейронов в этих областях гиппокампа при сравнении с группой ТМТ. Результаты иммунофлуоресцентного анализа выявили активацию микроглии в СА4 поля гиппокампа как у крыс группы ТМТ, так и у животных, к которым применяли фармакокоррекцию.

По всем исследуемым в данной работе параметрам выявлено, что фармакологическая коррекция с использованием только мемантина оказывала менее выраженный нейропротекторный эффект при экспериментальной нейродегенерации по сравнению с комбинированной фармакотерапией с использованием мемантина – блокатора NMDA рецепторов, а также аллостерического модулятора метаботропных рецепторов II группы LY379268 при сравнении с группой ТМТ.

Работа поддержана РНФ № 21-75-00106.



МУТАЦИЯ ГЕНА ГИПОКСАНТИГУАНИНФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ ПАРАМЕТРОВ БИОЭНЕРГЕТИКИ КЛЕТОК МОЗГА

Долгих А.И.¹, Тагунов П.А.¹, Винокуров А.Ю.¹, Жунусов Н.С.², Краюшкина А.М.²

¹ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия;

²ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия

dolgikhanig@mail.ru

Фермент гипоксантигуанинфосфорибозилтрансфераза (HPRT) участвует в «запасном» пути синтеза пуриновых нуклеотидов. Дефицит HPRT характеризуется избыточной продукцией мочевой кислоты, которая может, в том числе, оказывать неблагоприятное воздействие на работу митохондрий и поддержание необходимых параметров биоэнергетики клеток. Полный дефицит фермента ассоциируется с развитием синдрома Леша-Нихена. На данный момент не существует патогенетической терапии его неврологических симптомов, но детальное изучение механизмов развития патологии может способствовать решению этой проблемы.

Исследования проводили на первичной культуре нейронов и астроцитов среднего мозга и коры 0-3-дневных мышат, а также срезах коры и среднего мозга взрослых животных без мутаций и несущих в геноме мутацию del24-del26 delCGT, приводящую к развитию синдрома Леша-Нихена. Все исследования соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными и одобрены Этическим комитетом Орловского государственного университета имени И.С. Тургенева (протокол № 18 от 21.02.2020).

В качестве исследованных параметров выступали величина и механизм поддержания митохондриального мембранного потенциала (ММП), общее содержание окисленной и восстановленной форм никотинамиддинуклеотида (пула НАДН) в митохондриях, а также доля НАДН от пула (редокс-индекс НАДН). Для измерения ММП клетки инкубировали в 30 нМ растворе TMRM с последующим получением серии оптических срезов и определением величины максимальной флуоресценции. Механизм поддержания ММП оценивали по изменению сигнала TMRM во времени при добавлении олигомицина (2 мкг/мл), ротенона (3 мкМ) и FCCP (2 мкМ). Состояние НАДН анализировали по изменению уровня автофлуоресценции восстановленной формы кофермента при внесении FCCP и NaCN.

В нейронах и астроцитах первичной культуре коры и среднего мозга мутантных животных показан сниженный уровень величины ММП. В клетках, полученных от гомозиготных по мутации в гене HPRT животных, поддержание ММП обеспечивается АТФ-азной активностью V комплекса дыхательной цепи. При этом пул НАДН выше в образцах, полученных от гомозиготных по мутации в гене HPRT животных, в то время как редокс-индекс НАДН выше в контрольных образцах. В присутствии митохондриальных субстратов (пирувата и сукцината) происходит изменение работы V комплекса ЭТЦ на режим АТФ-синтазы.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1877.



ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТ АДЕНОЗИН КИНАЗУ, ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Жулай Г.А.¹, Шибаетов М.И.², Игнатъев К.С.³

¹Институт биологии – обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ Карельский научный центр
РАН, Петрозаводск, Россия;

²ГУБЗ Республиканская больница им. Баранова, Петрозаводск, Россия;

³ГУБЗ Республиканский онкологический онкодиспансер, Петрозаводск, Россия

zhgali-111@yandex.ru

В настоящее время хорошо установлено, что аденозиновый путь представляет значительный барьер для эффективной иммунотерапии рака и является важной терапевтической мишенью. Внеклеточный аденозин накапливается в микроокружении опухоли и оказывает иммуносупрессорное действие, препятствуя элиминации опухолевых клеток иммунокомпетентными клетками. Для Т-лимфоцитов существенную роль играет активация аденозинового рецептора A2AR, которая приводит к ингибированию эффекторных лимфоцитов и стимуляции супрессорных клеток. На сегодня активно изучается генерация аденозина эктонуклеотидазами CD39 и CD73 с целью их блокады для иммунотерапии рака. Однако в развитии аденозин-основанного подхода недостаточно хорошо рассмотрено избытие ферментных путей, управляющих балансом АТФ и аденозином. В этом отношении интересен фермент аденозин киназа (ADK), который обеспечивает метаболическое удаление аденозина. Целью работы было оценить экспрессию гена, кодирующего фермент ADK, и ее связь с содержанием CD39⁺ Т-клеток и экспрессией гена, кодирующего A2AR, в крови у больных колоректальным раком (КРР).

Материалом исследования служили образцы крови больных колоректальным раком, которые были разделены на 2 группы: больные с начальными стадиями заболевания (I-II) и больные с поздними стадиями заболевания (III-IV). Группу контроля составили здоровые лица сопоставимые по возрасту. Основными методами служили ПЦР в режиме реального времени и проточная цитометрия. Достоверность отличий показателей в группах сравнения определяли, используя коэффициент Манна-Уитни (при $p < 0,05$).

В ходе исследования были обнаружены достоверные различия в содержании мРНК гена ADK у больных КРР, находящихся на более поздних стадиях заболевания, по сравнению с контролем. Кроме того, у этой группы больных было достоверно повышено содержание мРНК длинной изоформы ADK-L, которая принимает участие в реакциях трансметилирования. Отмечено повышенное содержание мРНК гена аденозинового рецептора A2AR у больных с III-IV стадиями заболевания, однако достоверной корреляции между содержанием мРНК ADK и A2AR не обнаружено. Выявлены изменения в содержании Т-лимфоцитов, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39, в крови больных КРР по сравнению с контролем. Показано, что существуют достоверные корреляционные связи между содержанием мРНК ADK, в частности мРНК ADK-L, и содержанием CD4⁺CD39⁺ Т-клеток. Дальнейшее исследование позволит определить роль ADK в патогенезе КРР.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-00013.



КРЕНИГАЦЕСТАТ (LY3039478) КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР КАЛЬЦИФИКАЦИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

**Качанова О.С.¹, Лобов А.А.¹, Боярская Н.В.¹, Шишкова А.А.¹, Зайнуллина Б.Р.²,
Пичугин А.А.¹, Филиппов А.А.¹, Успенский В.Е.¹, Малашичева А.Б.¹**

¹ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава
России, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

kachanovaos15@gmail.com

Кальцификация сердечно-сосудистой системы – это распространенное нарушение, которое может быть как осложнением различных заболеваний, так и самостоятельной патологией. Среди отдельных форм этой патологии можно выделить кальцинирующую болезнь аортального клапана (КБАК). Несмотря на высокую смертность, хирургическая замена кальцинированного клапана все еще является единственным существующим вариантом лечения КБАК.

Остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток клапана (ИКК) является одним из ключевых факторов развития КБАК. Ранее была показана роль сигнального пути Notch как в развитии КБАК, так и в остеогенной дифференцировке ИКК. Ингибирование передачи сигналов Notch в ИКК может рассматриваться как перспективный подход для лечения КБАК.

Цель данной работы – тестирование ингибиторов сигнального пути Notch для подавления остеогенной дифференцировки первичных культур ИКК, полученных от пациентов с КБАК.

После выделения ИКК из операционного материала пациентов с КБАК мы индуцировали их к остеогенной дифференцировке без или с добавлением селективных ингибиторов Notch, СВ-103 или кренигацестата. Эффективность дифференцировки оценивали по уровню кальцификации (окрашивание Ализарином красным) и ПЦР в реальном времени (оценка уровня экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки). Изучение физиологического эффекта ингибиторов остеогенной дифференцировки проводили при помощи скорострельной протеомики с ионной подвижностью на платформе TimsToF Pro. Ингибитор СВ-103 не оказывает значимого ингибирующего воздействия на остеодифференцировку, в то время как кренигацестат полностью подавляет остеогенную дифференцировку ИКК и не демонстрирует очевидной цитотоксичности. При помощи протеомного анализа мы выявили потенциальные мишени кренигацестата. Нами было выявлено изменение экспрессии белков, ассоциированных с развитием скелета, например, фибриллина 1, и белков, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, например, LMOD1. Однако функция большинства из обнаруженных белков не была описана в контексте КБАК ранее, что свидетельствует о недостаточном понимании механизма действия кренигацестата и фундаментальных механизмов остеогенной дифференцировки ИКК.

Таким образом, кренигацестат эффективно подавляет остеогенную дифференцировку ИКК, что делает его перспективным действующим веществом для доклинических исследований.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего Образования Российской Федерации (номер соглашения 075-15-2020-901).



МОНОКЛОНАЛЬНАЯ ЛИНИЯ КЛЕТОК НЕК 293, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ СЕНСОРЫ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ cAMP И Ca²⁺

Котова П.Д.

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

polinakotova88@gmail.com

Сигналы, получаемые клеткой от GPCR-рецепторов, усиливаются в основном посредством аденилатциклазного и фосфолипазного путей трансдукции сигнала, активация которых приводит к значительному изменению концентрации вторичных посредников, cAMP и Ca²⁺ соответственно. Мониторинг внутриклеточного Ca²⁺ традиционно осуществляется с помощью синтетических флуоресцентных зондов методом микрофотометрии (Ca²⁺-imaging), который позволяет изучать Ca²⁺-процессы в динамике и на уровне одиночных клеток. Классическим методом измерения cAMP является радиоиммунный анализ (RIA), позволяющий измерять концентрацию cAMP в лизате клеток. Поскольку синтетических флуоресцентных cAMP-зондов на сегодняшний день не разработано, мониторинг cAMP внутри живой клетки стал возможен только с появлением генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров. Первые сенсоры cAMP работали на основе FRET и позволяли проводить ратиометрический мониторинг внутриклеточного cAMP в динамике, однако методика измерения FRET крайне сложна и требует специализированного оборудования. Недавно были разработаны одноволновые флуоресцентные генетически кодируемые сенсоры cAMP, сделавшие мониторинг этой молекулы более доступным, один из таких сенсоров – Pink Flamindo. Для мониторинга внутриклеточного Ca²⁺ также созданы генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, например, GEM-GECO1. Таким образом, благодаря последним разработкам стало возможным проводить одновременный мониторинг внутриклеточных cAMP и Ca²⁺ в живых клетках.

Такой мониторинг может быть осуществлен с помощью клеток, экспрессирующих сенсоры перечисленных молекул. Однако, в результате проведения липофекции клеток НЕК 293 с последующей селекцией на антибиотике обычно только около половины из них несут белки интереса. При этом уровень экспрессии встроенных белков значительно варьируется от клетки к клетке и падает с течением времени. Эффективность исследований физиологических процессов значительно возрастает при использовании моноклональных клеточных линий.

В результате последовательной липофекции клеток НЕК 293 плазмидными векторами Pink Flamindo и CMV-GEM-GECO1 нами была создана моноклональная линия клеток НЕК 293, стабильно и на высоком уровне экспрессирующих соответствующие сенсоры внутриклеточных cAMP и Ca²⁺. Полученная клеточная линия может быть использована для неинвазивного оптического мониторинга внутриклеточных cAMP- и Ca²⁺-сигналов, инициируемых, например, лигандами GPCR-рецепторов.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ МК-67.2021.1.4.



ВЛИЯНИЕ ТРОПОМОДУЛИНА НА АКТИН-МИОЗИНОВОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ В МИОКАРДЕ

Кочурова А.М.¹, Бельдия Е.А.², Матюшенко А.М.³, Щепкин Д.В.¹, Копылова Г.В.¹

¹ФГБУН Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН,
Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО Уральский федеральный университет имени первого Президента России
Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия;

³ФГУ ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

kochurova.a.m@mail.ru

Упорядоченность и стабильность структуры сократительного аппарата поперечнополосатых мышц определяется рядом белков, к которым относятся тропомодулины (Tmod). Tmod связывается с минус концом тонкой нити и предотвращает её разборку и присоединение новых глобул актина. Tmod имеет по два сайта связывания актина и тропомиозина (Трм) и взаимодействует с каждой из двух молекул Трм на актиновой нити. Трм в 1000 раз усиливает связывание Tmod1 с актиновой нитью, предотвращая её деполимеризацию (*Mudry et al., J Cell Biol., 2003*). Недавно обнаружено, что Tmod принимают участие в регуляции актин-миозинового взаимодействия, влияя на активацию тонкой нити. Показано, что нокаут гена TMOD1 у мышей ведет к замене изоформы Tmod1 в скелетных мышцах на Tmod3 и Tmod4, уменьшая подвижность Трм на актиновой нити и снижая количество поперечных мостиков в сильно-связанном состоянии и развиваемую ими силу (*Ochala et al., FASEB, 2014*).

Мы исследовали влияние Tmod1 на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде. Используя *in vitro* подвижную систему (ИПС), мы проанализировали зависимость скорости скольжения актин-тропомиозиновых (F-актин-Трм) филаментов по миозину от концентрации Tmod1 (*Matyushenko et al., Int J Biol Macromol. 2019*). Миозин выделяли из левого желудочка овцы. Изоформы сердечного тропомиозина альфа (Трм1.1) и каппа (Трм1.2) и Tmod1 экспрессировали в *E. coli* (*Matyushenko et al., Int J Biol Macromol. 2019*). Зависимость скорости скольжения F-актин-Трм филаментов от концентрации Tmod1 аппроксимировали экспоненциальной функцией и определили концентрацию Tmod1, при которой скорость уменьшалась в два раза (c_{50}).

Обнаружено, что Tmod1 не влияет на скорость скольжения актиновых нитей и F-актин-Трм филаментов, реконструированных с Трм1.2, но дозо-зависимо уменьшает скорость филаментов, содержащих Трм1.1. Значение c_{50} для F-актин-Трм1.1 филаментов составило 258 ± 77 нМ. Взаимодействие Tmod с Трм является изоформ специфическим. Ранее было обнаружено, что Tmod1 и Tmod3 с разной аффинностью связывают изоформы неммышечных Трм и Трм1.1 (*Yamashiro et al., The Journal Of Biological Chemistry, 2014*).

Таким образом, сердечная изоформа Tmod1 по-разному влияет на регуляторную функцию Трм1.1 и Трм1.2 и на актин-миозиновое взаимодействие в миокарде.

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП ИИФ УрО РАН, поддержано РФФ (гран № 22-24-00729).



НОВАЯ МОДЕЛЬ РЕЦИДИВА КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ПОСЛЕ ХИМИОТЕРАПИИ У МЫШЕЙ

Кузнецова Л.С.¹, Истомина М.С.², Маргулис Б.А.¹, Гужова И.В.¹, Лазарев В.Ф.¹

¹ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

lyubakuznetsov@gmail.com

Рецидив опухолевого роста – это процесс, в ходе которого опухоль, которая была почти полностью уничтожена в ходе терапии, возобновляет свою прогрессию. Такая опухоль не только плохо поддается лечению, но и имеет более агрессивное поведение, приводящее к ее ускоренному развитию и метастазированию в другие ткани организма. Таким образом, проблема рецидива опухоли является одной из центральных в онкологии. Изучение феномена рецидива опухоли осложнено проблематичностью воспроизведения этого процесса как в клеточных культурах, так и в животных моделях.

Целью данной работы являлось создание релевантной модели рецидива опухолевого роста после химиотерапии у мышей.

Центральным экспериментом данной работы являлась эктопическая инъекция раковых клеток в различном физиологическом состоянии мышам линии BALB/c. Все эксперименты выполнялись на двух клеточных линиях: линия СТ-26 wt, которая была получена из опухоли колоректального рака мыши линии BALB/c, а также клеточная линия СТ-26 iRFP-luc, экспрессирующая ген люциферазы и красного флуоресцентного белка. Клеточная линия СТ-26 wt использовалась нами в качестве «питающих» клеток (от англ. feeder), которые должны были почти полностью умереть в организме мыши через несколько дней после инъекции. Для этого за 24 часа до инъекции к клеткам добавляли ростовую среду, содержащую химиотерапевтический препарат этопозид. По завершении инкубации клетки промывали раствором натрий фосфатного буфера и смешивали с компонентами внеклеточного матрикса (Matrigel) для трансплантации мышам. Необходимая концентрация этопозида была подобрана в ходе предварительного анализа пролиферации клеток с помощью метода МТТ. Клетки линии СТ-26 iRFP-luc выступали в качестве акцепторных клеток, воспринимающих сигналы от «питающих» клеток, умирающих от действия этопозида. Верификацию опухолевого роста осуществляли с помощью метода прижизненной биолюминесценции. У мышей, которым вводились только акцепторные клетки (в количестве 20 тысяч), не происходило образование опухоли, однако совместное введение «питающих» (в количестве 1 миллион) и акцепторных (в количестве 20 тысяч) клеток приводило к образованию опухоли.

Таким образом, нами была разработана удобная модель рецидива опухолевого роста. Мы считаем, что стимуляция роста опухолевых клеток погибающей от химиотерапии частью популяции значительно повышает релевантность предложенной модели.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и Высшего образования РФ (проект № 075-15-2020-773).



СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СЕЗОННЫХ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ СЕЛЕЗЕНКИ ЯКУТСКИХ СУСЛИКОВ *UROCITELLUS UNDULATUS*

Лизоркина К.И.¹, Фадеева И.С.², Захарова Н.М.¹

¹Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия;

²ФБГУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

lizorkina_ksenii@mail.ru

Зимняя спячка – это приспособительная форма экономии энергии у животных, благодаря которой происходит адаптация к неблагоприятным условиям среды – низкой температуре и бескормице, путем обратимого снижения метаболизма и температуры тела. Несмотря на значительное снижение силы сердечных сокращений и замедлению кровотока, гибернарующие животные в периоды глубокого оцепенения не подвергаются гипоксии и тромбозу. Уникальные приспособительные особенности кровеносной системы позволяют им переживать гипотермию без опасности для их жизнедеятельности. При этом, наряду с другими факторами важную роль в этом играют органы кроветворной системы, в частности селезенка.

Целью исследования является сравнительный морфофункциональный анализ селезенки якутских сусликов в разных функциональных состояниях их годового цикла.

Материалы и методы. Исследования проводили на особях обоего пола *Uroditellus undulatus*. взятых в разные фазы их годового цикла: торпор (гипотермия, температура миокарда, $2,3^{\circ}\text{C}\pm 0,1^{\circ}\text{C}$; ректальная температура, $1,5^{\circ}\text{C}\pm 0,1^{\circ}\text{C}$, $n=8$); межбаутное пробуждение (нормотермия, $36-37^{\circ}\text{C}$, зимняя активность, в течение первых 5-12 ч после пробуждения, $n=6$); летняя активность (нормотермия, 38°C , $n=5$). Все процедуры на животных осуществляли в соответствии с Директивой 2010/63/EU. После извлечения исследуемых органов образцы тканей селезенки фиксировали в растворе нейтрального формалина по Лилли при 4°C , не менее 24 часов.

Результаты. Гистологический анализ тканей селезенки показал ярко выраженную гипертрофию красной пульпы, которая была перенасыщена форменными элементами крови. Если в летний период соотношение паренхиме к строме было 1:1, то в период торпора это значение менялось на 5:1. В период межбаутных пробуждений происходило опорожнение красной пульпы от ФЭК со снижением соотношения объема паренхимы к строме до 1,5:1.

Заключение. В период торпора у сусликов наблюдается спленоменгалия, которая вызвана накоплением эритроцитов в межинтерстициальном пространстве паренхимы. По-видимому, это связано со снижением скорости кровотока во время гипотермии при неизменной интенсивности эритропоэза, а накопление эритроцитов в селезенке обусловлено адаптивным ответом, направленным на предотвращения гипоксии. В период межбаутных пробуждений, когда животному нужна энергия, эритроциты возвращаются обратно в кровотоки, чтобы обеспечить организм кислородом.



ИССЛЕДОВАНИЕ АНЕСТЕЗИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА ДЕКСМЕДЕТОМИДИНА ГИДРОХЛОРИДА В ГИППОКАМПЕ НОВОРОЖДЕННЫХ ГРЫЗУНОВ *IN VIVO*

Логашкин А.Е., Олейников А.В., Минлебаев М.Г.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

anatolijlogaskin@gmail.com

Введение. Современные исследования в нейробиологии часто нуждаются в использовании анестезии. Среди анестетиков наиболее широко применяется инъекционный анестетик – уретан. В последнее время его использование ограничивается из-за ряда негативных эффектов, связанных с его применением. Вследствие этого появляется необходимость поиска других анестетиков, которые могли бы заменить уретан. Однако, в то время как эффекты уретана на центральную нервную систему хорошо изучены, остается вопрос степени воздействия других анестетиков на функционирование головного мозга.

Материалы и методы. Для ответа на этот вопрос мы провели серию экспериментов, где исследовали воздействие одного из широко используемых анестетиков α -адреномиметика дексмететомидина гидрохлорида (Дексдомитор) на гиппокампальную активность новорожденных крысят. Регистрировалась спонтанная активность в контроле, под действием дексмететомидина гидрохлорида и под действием уретана. В качестве свойств, характеризующих изменение происходящие под действием анестезии мы использовали анализ встречаемости спонтанной активности – ранних острых волн (рОВ), их амплитудно-временные характеристики и движения животного.

Результаты. В ответ на аппликацию дексмететомидина гидрохлорида наблюдалось падение частоты встречаемости спонтанной активности на 60% в сравнении с контролем, в то время как на фоне уретана падение составляло 85%. Это сопровождалось уменьшением двигательной активности соответственно в 1.5 и в 3 раза. Длина и амплитуда рОВ практически не подвергались изменениям (падение амплитуды рОВ на 25% в краевом слое наблюдалось только на введение уретана).

Вывод. Дексмететомидин гидрохлорид показал свою эффективность как анестетик в развивающейся нервной системе. Несмотря на необходимость проведения дальнейших исследований для определения дозозависимых эффектов, уже на настоящий момент можно сделать вывод о возможном использовании дексмететомидина гидрохлорида для замены уретана.



ЛАЗЕРНАЯ ДОППЛЕРОВСКАЯ ФЛОУМЕТРИЯ В ПОРТАТИВНОЙ РЕАЛИЗАЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

**Локтионова Ю.И.¹, Жарких Е.В.¹, Михайлова М.А.^{1,2}, Королев А.И.², Горшков А.Ю.²,
Федорович А.А.^{2,3}, Жеребцов Е.А.^{1,4}**

¹ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева,
научно-технологический центр биомедицинской фотоники Орел, Россия;

²ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической
медицины Минздрава России, Москва, Россия;

³ГНЦ РФ – институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия;

⁴Департамент оптоэлектроники и измерительной техники университета Оулу,
Оулу, Финляндия

julya-loktionova@mail.ru

Артериальная гипертензия (АГ) характеризуется повышением артериального давления (АД). Сложность выявления заболевания заключается в его частом бессимптомном течении. В настоящее время для диагностики АГ используется суточный мониторинг артериального давления, однако мониторинг состояния микроциркуляторного русла отсутствует. Поэтому необходимо разработать метод быстрой и неинвазивной диагностики влияния повышенного АД на функциональное состояние системы микроциркуляции.

Целью данной работы было изучение возможности использования носимых лазерных анализаторов для выявления особенностей микроциркуляторного русла, связанных с гипертонией.

В выборку вошли 89 мужчин в возрасте от 27 до 69 лет ($44,0 \pm 9,7$). Все участники считали себя здоровыми и не принимали никаких лекарств. Волонтерам был проведен суточный мониторинг АД, по результатам которого они были разделены на две группы. В 1-ю группу вошли 30 мужчин с нормальным АД ($43,4 \pm 9,8$ года), а во 2-ю группу вошли 59 мужчин с АГ ($45,5 \pm 9,7$ лет). В исследовании использовался носимый лазерный анализатор микроциркуляции крови «ЛАЗМА-ПФ» (НПП «ЛАЗМА», Москва), реализующий метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Устройство закреплялось на тыльной стороне левого запястья.

Для статистического анализа использовался критерий Манна-Уитни. Во второй группе волонтеров с АГ отмечается значительное снижение амплитуд нейрогенных и миогенных осцилляций, что говорит о повышении тонусов вазомоторных механизмов. На фоне сохраненного уровня тканевой перфузии амплитуды пульсовых колебаний кровотока также значительно ниже у второй группы, по сравнению с первой. У пациентов с АГ значительно снижена перфузионная эффективность эндотелиального, нейрогенного, миогенного и пульсового компонентов.

Более чем у половины добровольцев (66%) впервые была выявлена АГ, сопровождающаяся функциональными изменениями в микрососудистом русле. В выборку вошли мужчины трудоспособного возраста, которые не имели симптомов повышенного АД и считали себя здоровыми.

Полученные результаты подтвердили проблему поздней диагностики АГ из-за ее бессимптомного течения. Несвоевременное выявление заболевания и отсутствие



специализированной медицинской помощи могут привести к инвалидности и смерти. Исследование показало, что информация, получаемая с помощью портативного ЛДФ-устройства, может быть полезна при определении причин АГ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-08-01153.

ЯМР-МЕТАБОЛОМИКА В ИЗУЧЕНИИ НОКАУТНЫХ ЖИВОТНЫХ

Марьясина С.С., Аверина О.А., Емельянова М.А., Сергиев П.В., Польшаков В.И.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

sofia.mariasina@yandex.ru

Нокаутные животные являются золотым стандартом для изучения функций генов млекопитающих. Важной задачей в таких исследованиях является идентификация фенотипа полученных нокаутных животных, в частности, изучение их метаболома.

Метаболом – совокупность всех низкомолекулярных веществ, принимающих участие в химических реакциях в клетке, органе или целом организме. В эту категорию попадают все биомолекулы, за исключением биополимеров: белков, полисахаридов и нуклеиновых кислот. Состав метаболома, как завершающей фазы в цепочке *геном – транскриптом – протеом – метаболом*, наиболее подвержен изменениям и позволяет получить информацию о реакции организма на различные факторы, в том числе – неправильное функционирование или отсутствие каких-либо генов или наличие различных заболеваний. Взаимосвязь метаболома с заболеваниями может служить отправной точкой для понимания того, какие заболевания протекают в организме. В этом случае aberrантная концентрация метаболитов в различных органах может служить маркером протекания определенных заболеваний.

Метаболом млекопитающих состоит из более чем 30000 индивидуальных низкомолекулярных соединений с большим химическим разнообразием и динамическим диапазоном концентраций. Для анализа низкопредставленных метаболитов преимущественно используют различные варианты хроматографических методов в сочетании с масс-спектрометрией, обеспечивающие высокую чувствительность, но имеющие низкую воспроизводимость и отличающиеся сложностью и дороговизной пробоподготовки. С другой стороны, для анализа более представленных метаболитов используют спектроскопию ЯМР. Этот метод отличает высокая воспроизводимость и простота пробоподготовки.

При изучении животных наиболее доступным и востребованным метаболомным исследованием является определение метаболома мочи и плазмы/сыворотки крови. С помощью ЯМР удаётся количественно детектировать около 60 метаболитов в моче и около 50 – в крови.

В настоящей работе методами ЯМР изучается влияние инактивации нескольких генов на функционирование организма на моделях мышинных линий. Сравнение метаболома нокаутных мышей с линиями дикого типа позволило установить связь между функциями генов и их фенотипическим проявлением.

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 9-14-00115 и РФФИ № 21-64-00006.



РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ МИТОФАГИИ В КЛЕТКАХ СИНУКЛЕИНАМИ

Микенькина М.А.¹, Чапров К.Д.^{2,3}, Бережнов А.В.^{1,4}

¹ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия;

²ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия;

³ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия;

⁴Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

margarita.mikenkina@yandex.ru

Синуклеины представляют собой семейство высококонсервативных белков, специфичных для позвоночных, и концентрируются в пресинаптических терминалях нейронов, участвуя в регуляции везикулярного высвобождения и рециркуляции нейротрансмиттеров. Физиологическая роль синуклеинов полностью не установлена, однако, исследования показывают их ключевую роль в повышении эффективности АТФ-синтазы и модуляции процессов высвобождения дофамина из пресинаптических терминалей в областях мозга, уязвимых при болезни Паркинсона (БП), в связи с чем БП в настоящее время принято рассматривать как прогрессирующую и мультисистемную синуклеинопатию.

Целью работы являлось определение роли α - и γ -синуклеинов в реализации селективной аутофагии митохондрий (митофагии) – ключевого процесса предотвращения клеточной гибели, благодаря которому поврежденные митохондрии (МХ) подвергаются деградации с участием лизосом, что играет важную роль как в терминально дифференцированных, таких как нейроны, так и медленно пролиферирующих клетках.

Исследования выполняли на первичной нейроглиальной культуре, полученной из коры мозга мышей с двойным нокаутом α - и γ -синуклеина, а также контрольных мышей без модификации генома. Для визуализации МХ и лизосом, и регистрации их колокализации использовали двойное окрашивание флуоресцентными зондами MitoTracker Green и LysoTracker Red DND-99 соответственно. Регистрацию флуоресценции осуществляли методом конфокальной микроскопии (ZEISS LSM 900). Количественно уровень митофагии определяли по степени колокализации МХ и лизосом.

Выявлено, что в клетках нейроглиальной культуры, полученной из нокаутной линии животных, наблюдается высокий по сравнению с контролем уровень митофагии, свидетельствующий о высокой степени повреждения МХ, возможно, в результате отсутствия α - и γ -синуклеинов, несмотря на отсутствие данных о непосредственном вовлечении данных белков в реализацию самого механизма утилизации дефектных МХ.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1877.



НАРУШЕНИЯ СПОСОБНОСТИ К ОБУЧЕНИЮ КРЫС DAT-KO

Назаров И.Р.^{1,2}, Пестерева Н.С.¹, Артёмов В.С.^{1,2}, Трактиров Д.С.¹

¹ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия

inazarovgm@gmail.com

Дофамин (DA) – нейромедиатор, регулирующий многие физиологические процессы, например, двигательную активность, системы мотивации и вознаграждения. Нарушение обмена DA связывают со многими нейropsychологическими заболеваниями: шизофренией, обсессивно-компульсивным расстройством, болезнью Паркинсона, синдромом дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ). СДВГ – начинающееся в детстве заболевание, характеризующееся нарушением концентрации внимания, гиперактивностью, импульсивностью. Для исследования данного заболевания были выведены крысы DAT-KO, имеющие нокаут гена обратного захвата дофамина – DAT. У данных животных наблюдаются основные симптомы СДВГ.

В работе (N.P. Kurzina et al., 2020) оценивали способность крыс DAT-KO решать сложные когнитивные задачи на основе пространственной рабочей памяти. Для этого крыс тестировали в восьмилучевом лабиринте. Крысы WT (контрольные крысы Вистар) тратили меньше времени на выполнение задания по сравнению с DAT-KO крысами ($p < 0,05$).

Цель. Исследовать пространственную память и способность к обучению базовым задачам у крыс DAT-KO.

Материалы и методы. В нашем исследовании пространственная память трех групп крыс DAT-KO, HET (гетерозигота DAT), WT (каждая группа $n=4$) оценивалась с помощью теста «Лабиринт Морриса». Оценку способностей крыс к обучению проводили с помощью выработки условного рефлекса активного избегания (УРАИ) в течение трех дней. Исследование проводили в кольцевой камере, в которую подавали звуковые и световые сигналы. Все данные представлены как средние $M \pm SEM$, использовался t-критерий Стьюдента.

Результаты. В тесте лабиринт Морриса фиксировалось время, за которое крыса впервые пересечет область, в которой ранее находилась платформа. Крысы WT справлялись с этим заданием значительно быстрее ($12,8 \pm 8,0$ с, $p \leq 0,05$), чем HET крысы ($49,3 \pm 9,5$ с, $p \leq 0,05$). Из крыс DAT-KO лишь одна пересекла область платформы за отведенные 1,5 минуты тестирования. В тесте УРАИ было показано, что время, потребовавшееся крысам DAT-KO для избегания негативного стимула, было значительно выше, чем у крыс WT во второй (для DAT-KO $110,1 \pm 39,7$ с, WT $39,1 \pm 15,8$ с) и третий (для DAT-KO $171,8 \pm 43,1$ с, WT $69,9 \pm 33,8$ с) дни тестирования ($p \leq 0,05$).

Вывод. Крысы DAT-KO обучаются менее эффективно, чем крысы WT. Эти можно объяснить трудностями запоминания животными DAT-KO пространственной конфигурации и дефицитом рабочей памяти.



САМООРГАНИЗАЦИЯ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ПУТЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНОЙ
КОНДЕНСАЦИИ ПРИВОДИТ К ФОРМИРОВАНИЮ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ
ГЕТЕРОГЕННОСТИ СВОЙСТВ И ОПРЕДЕЛЯЕТ ПРЕВАЛИРУЮЩЕЕ НАПРАВЛЕНИЕ
ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ

**Нимирицкий П.П., Еремичев Р.Ю., Александрович Н.А., Басалова Н.А.,
Новоселецкая Е.С., Макаревич П.И.**

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

nimiritsky@gmail.com

Вопрос восстановления микроархитектуры тканей – центральный для регенеративной медицины. Одним из способов их формирования в онтогенезе является самоорганизация мезенхимных клеток путем конденсации. Мы изучили механизмы и последствия самоорганизации мультипотентных стромальных клеток (МСК) и показали, что их самоорганизация приводит к формированию пространственно-гетерогенного распределения клеток с разными свойствами, а конденсация клеток определяет их тип дифференцировки.

Мезенхимные клетки в течение всего онтогенеза обладают способностью к самоорганизации путем конденсации, опосредованной дифференциальной межклеточной адгезией, миграцией, перестройками цитоскелета. Мы использовали клеточные пласты из МСК человека в качестве модели спонтанной (без экзогенных воздействий) самоорганизации МСК для демонстрации её структурного и транскрипционного влияния, эффектов на дифференцировочную судьбу клеток, а также исследования потенциального механизма самоорганизации. Мы использовали формирование КП для визуализации процесса самоорганизации и оценили роль сигнального пути ГТФаз Rho в спонтанной конденсации, которая приводит к формированию областей, значительно различающихся по клеточной плотности.

Было обнаружено, что конденсация МСК повышала эффективность дифференцировки в остеогенном и хондрогенном, но не адипогенном направлениях. С помощью лазерной микродиссекции мы препаративно разделили КП на субпопуляции клеток, в разной степени вовлеченных в компактизацию, а с помощью секвенирования РНК установили эффекты компактизации и её предполагаемые механизмы. Анализ свойств МСК, претерпевших конденсацию, показал, что эти клетки имеют черты характерные для дифференцирующихся в остеогенном направлении клеток (локальная активность щелочной фосфатазы, обогащенный коллагеном I типа внеклеточный матрикс, характерные черты метаболизма). Секвенирование РНК показало транскрипционные сдвиги, включающие активацию пути ГТФаз Rho и подавление активности ключевого для адипогенеза транскрипционного фактора SREBP. Мы использовали ингибиторный анализ, чтобы показать, что при самоорганизации МСК в КП Rho-зависимая конденсация определяет формирование в изначально гомогенном конструкторе пространственной гетерогенности свойств клеток, а также изменения в способности к дифференцировке клеток, в разной степени претерпевших конденсацию.

Таким образом, конденсация МСК в клеточных пластах может рассматриваться как модель самоорганизации клеток при восстановлении микроархитектуры тканей некоторых органов после повреждения.



МЕТФОРМИН УЛУЧШАЕТ КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ КРЫС

Обухова Д.А.¹, Зубов А.С.²

¹ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

obuhova.da@edu.spbstu.ru

Введение. Метформин – лекарственный препарат класса бигуанидов, часто назначаемый при лечении сахарного диабета 2-го типа. Среди сахароснижающих препаратов метформин выделяется эффектами, выходящими за рамки контроля гипергликемии, такими как уменьшение резистентности к инсулину, улучшение эндотелиальной дисфункции, гомеостаза. Однако, действие метформина на ЦНС, в частности, на когнитивные функции, до сих пор плохо изучено.

Цель. Изучить влияние хронического введения метформина на когнитивные функции взрослых крыс.

Материалы и методы. В экспериментах использовали 36 самцов крыс Вистар. В возрасте 6-ти месяцев тестировали когнитивные функции при помощи водного лабиринта Морриса и У – лабиринта. Далее крыс разделили на три группы – группа 1 (ежедневное интраперитонеальное (i.p.) введение хлорида натрия в дозе 1 мл/крысу на протяжении 3-х недель, n=12), группа 2 (ежедневное i.p. введение метформина в дозе 50 мг/кг на протяжении 3-х недель, n=12), группа 3 (ежедневное i.p. введение метформина в дозе 100 мг/кг на протяжении 3-х недель, n=12). На 7-ой месяц жизни сохранность когнитивных функций проверяли также при помощи водного лабиринта Морриса и У – лабиринта.

Результаты. Установлено, что в водном лабиринте Морриса время пребывания в зоне, где находилась платформа у крыс в возрасте 6-ти месяцев (25,8 (16,3; 36,1) секунд) и у тех же крыс в возрасте 7 месяцев (23,7 (11,7; 38,3) секунд) статистически не различалось, $p = 0,13$. Введение метформина в дозе 100 мг/кг по выбранной схеме приводило к увеличению времени пребывания в зоне, где находилась платформа (37,2 (29,1; 46,7) секунд) в водном лабиринте Морриса по сравнению с контролем (23,7 (11,7; 38,3) секунд), $p = 0,019$. При тестировании в У – лабиринте была выявлена тенденция к уменьшению % чередования норок в возрасте 7 месяцев (61,1 (47,6; 70,7)) по сравнению с теми же крысами в 6 месяцев (66,03 (65,0; 72,7)), однако данные статистически не значимы, $p = 0,21$. При этом введение метформина в дозе 100 мг/кг увеличивало % чередования норок (74,8 (58,5; 86,1)) по сравнению с контрольными животными в возрасте 6-ти и 7-ми месяцев, $p = 0,0001$, $p = 0,013$, соответственно. Изменения в показателях когнитивных функций для группы 2 относительно контрольной группы 1 статистически не значимы.

Выводы. Интраперитонеальное введение метформина в дозе 100 мг/кг на протяжении 3-х недель приводит к улучшению когнитивных функций у крыс в возрасте 7 месяцев.



НАРУШЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В МОДЕЛИ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ

Палалов А.А., Серёгина Е.С., Потапова Е.В.

ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орёл, Россия

d.alexanderpalalov@yandex.ru

Нарушение энергетического метаболизма в опухолевых клетках является одним из ключевых признаков злокачественных образований. В большинстве неопластических клеток наблюдается изменение биоэнергетики с преимущественным получением энергии путем анаэробного гликолиза (т.н. эффект Варбурга) или с использованием лактата в качестве главного источника АТФ. В обоих случаях нарушается функционирование системы окислительного фосфорилирования митохондрий. Для гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) характерны соматические мутации, связанные с отдельными комплексами цепи переноса электронов, а также эпигенетические модификации, снижающие функционирование ферментов окислительного фосфорилирования. Обнаружение стереотипных изменений энергетического метаболизма в клетках ГЦК может позволить уточнить механизмы онкогенеза, а также повысить чувствительность и специфичность существующих диагностических методов, в том числе малоинвазивной тонкоигольной пункционной биопсии печени.

Исследование проводилось на первичной культуре гепатоцитов линии мышей C57Bl и модели гепатоцеллюлярной карциномы мышей H33. Для оценки работы митохондрий был определен митохондриальный мембранный потенциал ($\Delta\Psi_m$) с помощью флуоресцентного зонда TMRM и уровень НАДН, основной субстрат цикла Кребса митохондрий. Общее содержание НАДН определялось путем внесения FCCP и ротенона для разобщения окисления и фосфорилирования. Значение содержания НАДН рассчитывалось как разница между минимальным значением после внесения FCCP и максимальным после внесения ротенона уровнем флуоресценции НАДН. Статистически значимой считали разницу при $p \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Согласно результатам исследования, в клетках ГЦК было выявлено увеличение $\Delta\Psi_m$ по сравнению с контрольными гепатоцитами. При внесении ротенона, ингибитора I комплекса цепи переноса электронов митохондрий, в клетках ГЦК наблюдалось менее значимое снижение флуоресценции TMRM, чем в гепатоцитах. Общее содержание НАДН в гепатоцитах при этом было выше, чем в клетках ГЦК. Наблюдаемый эффект может свидетельствовать о сниженной продукции НАДН, что частично ингибирует функцию I комплекса цепи переноса электронов митохондрий в ГЦК. В опухолевых клетках данный феномен, вероятно, компенсируется активацией II комплекса. Полученные данные лягут в основу разработки технологии распознавания опухолевой ткани, которая может повысить точность существующих диагностических процедур.

Работа выполнена в рамках проекта Российского научного фонда № 21-15-00325.



РОЛЬ ПАННЕКСИНА 1 В РЕГУЛЯЦИИ СОКРАТИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОРТАЛЬНОЙ ВЕНЫ МЫШИ

Печкова М.Г.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

marta.peckovva@gmail.com

Паннексины – семейство канальных белков, основной функцией которых считается транспорт АТФ из цитоплазмы в межклеточное пространство. Из трех членов этого семейства наиболее представленным в организме млекопитающих является паннексин 1 (Panx1), он обнаруживается в разных органах, включая артерии и вены. Известно, что в артериях Panx1 колокализован с α_{1D} -адренорецепторами (α_{1D} -АР) и участвует в регуляции сократительных реакций. Однако данных о роли Panx1 в венозных сосудах нет. Поэтому целью данной работы было исследование участия Panx1 в регуляции сокращения вен.

В экспериментах использовали самцов мышей с глобальным нокаутом гена Panx1 (КО) и мышей линии C57Bl/6J (WT). Объектом исследования была портальная вена. Вену освобождали от окружающих тканей, вырезали фрагмент длиной 7-10 мм и закрепляли в установке для регистрации сокращения в изометрических условиях. В начале каждого эксперимента препарат растягивали до базального уровня силы 2 мН, оставляли для уравнивания на 15 минут, затем активировали KCl (60 мМ). Оценивали частоту и амплитуду ритмических сокращений вены.

В фоне частота ритмических сокращений была выше у мышей КО (11.5 ± 1.8 сокр./мин) по сравнению с WT (10.0 ± 2.7 сокр./мин), амплитуда сокращений не различалась. Далее исследовали эффекты вазоактивных веществ, которые описаны в литературе как регуляторы состояния каналов Panx1. Изменения частоты и амплитуды сокращений вены при действии KCl (7-17 мМ), ацетилхолина (10^{-6} М, 10^{-5} М), DEA-NO (10^{-6} М), агониста α_1 -АР метоксамина (10^{-6} – 10^{-4} М) и норадреналина (10^{-6} – 10^{-4} М) не различались между КО и WT. Однако реакция вены на фенилэфрин (ФЭ), который обладает более высоким сродством к α_{1D} -АР, чем метоксамин, была сильнее выражена у группы WT, чем у КО.

Экзогенный АТФ (10^{-6} М и 10^{-5} М) увеличивал частоту сокращений портальной вены, реакции на АТФ были увеличены у WT по сравнению с КО. Вклад эндогенного АТФ в сократительные реакции, вызванные ФЭ, оценивали с помощью эктонуклеотидазы апиразы (10 Е/мл). На фоне апиразы реакция на ФЭ у группы WT снижалась, а у КО оставалась неизменной, что свидетельствует об изменении уровня внеклеточного АТФ под действием апиразы у WT, но не у КО.

Таким образом, в портальной вене мышцы секреция АТФ через каналы Panx1 может зависеть от активности α_1 -АР, как и в артериях. Отсутствие вклада Panx1 у мышей КО может приводить к изменению экспрессии или активности других компонентов пуринергической системы, включая пуринорецепторы и эктонуклеотидазы гладкомышечных клеток.



НОВЫЙ ПОДХОД К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СПЕЦИАЛИЗАЦИИ НЕЙРОНОВ

Плюснин В.В.^{1,2}, Торопова К.А.^{1,2}, Ивашкина О.И.^{1,2}, Анохин К.В.^{1,2,3}

¹ФГБУ НИЦ Курчатовский Институт, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

³ФГБНУ НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Москва, Россия

viktor.plusnin@phystech.edu

Вопросы о клеточных механизмах отражения мозгом информации об окружающей среде традиционно находятся в центре внимания нейронауки. Нейрофизиологические исследования показывают, что при знакомстве животных с пространством или объектами активность нейронов их мозга специализируется относительно этих аспектов среды. Примерами таких нейронов являются клетки места, расположенные в поле CA1 гиппокампа мышей. В последнее время, с развитием технологии прижизненного оптического кальциевого имиджинга, стало возможным наблюдать активность большого числа нейронов одновременно в свободно движущейся мыши. При этом в сравнении с электрофизиологическими данными нет общего стандарта в алгоритмах определения специализаций нейронов. Такой алгоритм должен обладать высокой чувствительностью и специфичностью, при этом иметь возможность определять несколько пространственных специализаций у одного нейрона и работать с достаточно шумными и разреженными данными кальциевой активности.

В данной работе авторами предлагается такой алгоритм определения пространственной специализации нейронов на основе подсчета собственной информации. Особенность этого алгоритма в том, что он позволяет количественно рассчитать значение закодированной пространственной информации в нейроне относительно каждого поля специализации. Для этого пространство клетки разбивалось на равные сектора, высчитывалось время, проведенное мышью в каждом секторе, и количество спайковых событий на сектор. Полученные карты сглаживались гауссовым фильтром и высчитывалась карта активности (частота спайкования на сектор) делением сглаженной карты количества спайков на сглаженную карту размещения. Далее с помощью алгоритма WaterShed карта активности разделялась на области, для каждой из которой рассчитывалась собственная информация. Затем производилось 1000 различных сдвигов временных рядов кальциевой активности и местоположения мыши, для каждого сдвига вычислялась собственная информация. Область с собственной информацией большей, чем у 95% сдвигов, считалась информативной и являлась полем места для этого нейрона. Мы провели сравнение этого метода с другими наиболее распространенными методами на смоделированных датасетах, а также на реальных данных, полученных с использованием минискапа NVista.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 20-15-00283 и междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».



ПРЕДУСМОТРИТЕЛЬНОСТЬ КАК ФАКТОР ОПРЕДЕЛЕНИЯ УСПЕШНОСТИ
ВООБРАЖЕНИЯ ДВИЖЕНИЙ ВЕРХНИХ И НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ ПРИ
УПРАВЛЕНИИ ИНТЕРФЕЙСОМ «МОЗГ-КОМПЬЮТЕР»

Пляченко Д.Р.¹, Решетникова В.В.², Вершинина Е.А.², Боброва Е.В.²

¹ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН Институт физиологии имени И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

st069997@student.spbu.ru

Интерфейсы «мозг-компьютер» (ИМК), основанные на кинестетическом воображении движений – широко используемая для нейрореабилитации система.

Цель исследования – выявить влияние личностных характеристик на успешность распознавания сигналов мозга при воображении движений стоп, кистей и локомоции.

В эксперименте приняли участие 10 здоровых испытуемых, которые на протяжении 10 дней осуществляли воображение движения раскрытия кисти, тыльного сгибания стопы и локомоции. Определение точности классификации состояний мозга проводилось при сравнении воображения движений левой конечности относительно покоя (REST vs LEFT), правой относительно покоя (REST vs RIGHT) и левой относительно правой (LEFT vs RIGHT). По окончании эксперимента испытуемые прошли тесты Кеттелла (16-факторный), Большая Пятерка (5-факторный тест личности), Айзенка.

В результате исследования было получено, что личностные характеристики «Предусмотрительность» и «Самоконтроль», определенные по тесту Большая пятерка, показывают больше значимых корреляций с точностью классификации стоп, чем кистей и локомоции. Также было выявлено, что у людей с большей выраженностью характеристики «предусмотрительность» коэффициенты корреляции с точностью классификации воображения кистей выше при сравнении условий REST vs LEFT, чем REST vs RIGHT, а LEFT vs RIGHT ниже их обоих, что указывает на то, что предусмотрительные люди лучше воображали движение левой кисти. Помимо этого, в процессе исследования были получены другие закономерности, связанные с другими личностными характеристиками. Данные результаты могут быть использованы для разработки индивидуальных подходов к применению ИМК.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ № 22-25-00624.



ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ В КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ «ЭНДОМЕТРИОЗ»

**Погонялова М.Ю., Виривская Е.В., Микенькина М.А., Уколова П.А., Попов Д.Ю.,
Кузнецова Е.А., Винокуров А.Ю.**

ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия

mpogonalovalova@gmail.com

В результате эндометриоза происходит разрастание доброкачественной эндометриальной ткани за пределами полости матки, которое встречается примерно у 10-15% женщин репродуктивного возраста. Сегодня предполагается, что в патологии таких хронических воспалительных заболеваний немаловажную роль играет митохондриальная дисфункция, природа которой в каждом случае, малоизвестна. Изучение данного вопроса весьма актуально с позиции как понимания механизмов заболевания, так и поиска возможных терапевтических мишеней.

Исследования проводили на клетках, выделенных из тканей пациентов с диагнозом «эндометриоз», а также условно-здоровых пациентов. Экспериментальными образцами выступали аспират условно-здоровых пациентов (контроль), аспират и миометрий при аденомиозе, ткань кисты и аспират при эндометриозе. Сразу после отбора пробы обрабатывали трипсином на холоде в течение 16 часов, с последующей обработкой коллагеназой I типа при 37 °С. Культивирование выделенных клеток осуществляли в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 1% пирувата и 1% PenStrep. Изучение биоэнергетических параметров клеток проводили на конфокальном микроскопе ZEISS LSM 900. Оценку величины митохондриального мембранного потенциала (ММП) проводили на основе интенсивности флуоресценции зонда TMRM. Для изучения механизма поддержания ММП проводили регистрацию интенсивности флуоресценции TMRM во времени с записью базового сигнала с последующим добавлением олигомицина (2 мкг/мл), ротенона (3 мкМ) и FCCP (3 мкМ).

Анализ данных на первично выделенных клетках показал, что уровень ММП в образцах с патологией варьируется в зависимости от типа клеток. После культивирования в полной ростовой среде величина ММП во всех патологичных образцах оказалась ниже, чем в контроле. При этом анализ механизма поддержания ММП показывает наличие патологии для первично выделенных клеток: происходит снижение сигнала TMRM в ответ на введение ингибитора АТФ-синтазы, что говорит о работе данного комплекса в АТФ-азном режиме, а также наблюдаются нарушения в работе I комплекса, находящие отражение в отсутствии реакции в ответ на ротенон. В случае ряда образцов клеток культивирование в полной ростовой среде приводит к восстановлению функции АТФ-синтазы, а также к нормальной работе I комплекса дыхательной цепи. Дополнительные эксперименты с первично выделенными культурами и предварительным инкубированием в присутствии пирувата показали положительное влияние данного субстрата на механизм обеспечения величины ММП.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1877.



ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК NEAT1_1 ЧЕЛОВЕКА НА ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПОВЕДЕНЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ

Пукаева Н.Е.^{1,2}, Залевская В.Н.^{1,2}, Овчинников Р.К.^{1,3}, Кухарский М.С.^{1,3}

¹ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия;

²ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России,
Томск, Россия;

³ФГАОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

nadya.pukaeva@mail.ru

Длинная некодирующая РНК NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) имеет важное значение для функционирования нервной системы и вовлечена в развитие ряда нейродегенеративных и психических заболеваний. В нервной ткани пациентов при этом наблюдалось изменение уровня экспрессии NEAT1. Предположительно повышение уровня NEAT1 играет протекторную роль для нервных клеток. В то же время есть данные, указывающие на возможное патогенетическое значение NEAT1. Для моделирования избыточности функции данной РНК была получена новая линия трансгенных мышей (NEAT1_1Tg), экспрессирующих короткую изоформу NEAT1_1 человека.

Целью данного исследования являлась оценка влияния повышенной экспрессии длинной некодирующей РНК NEAT1_1 в нервной системе на поведение и транскриптом коры головного мозга трансгенных мышей линии NEAT1_1Tg.

На первом этапе была проведена оценка экспрессии трансгена NEAT1_1 в нервной системе. Проведено секвенирование РНК, выделенной из коры головного мозга трансгенных и контрольных животных, с последующей оценкой функционального значения дифференциально экспрессирующихся генов при использовании биоинформатических ресурсов. Для обнаружения фенотипических проявлений, вызванных повышением уровня NEAT1_1, проводилось тестирование животных, с использованием стандартных поведенческих парадигм.

В результате было показано, что трансгенная кассета NEAT1_1 экспрессируется во всех отделах нервной системы и не влияет на уровень экспрессии собственной Neat1 мыши. У трансгенных животных в сравнении с контрольными мышами наблюдались изменения в экспрессии генов, связанных с регуляцией апоптоза, пролиферации, образованием аксонов и синаптической передачей. Поведенческое тестирование показало, что у мышей NEAT1_1Tg не наблюдалось отклонений в двигательной активности и кратковременной памяти. В то же время они демонстрировали сниженный уровень тревожности и нарушение формирования долговременной памяти.

Таким образом можно сделать вывод о том, что эктопная экспрессия длинной некодирующей РНК NEAT1_1 человека в нервной системе мышей приводит к изменению экспрессии генов, вовлеченных в регуляцию процессов, связанных с нейрональной пластичностью, что сопровождается нарушениями функций нервной системы, в частности формированием памяти.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 22-25-00645.



ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЬЦИЕВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ БАЗОЛАТЕРАЛЬНОЙ МИНДАЛИНЫ И ПОЛЯ СА1 ГИППОКАМПА У МЫШЕЙ С НОРМАЛЬНОЙ И НАРУШЕННОЙ ПАМЯТЬЮ

Рогожникова О.С.¹, Ивашкина О.И.^{1,2}, Торопова К.А.^{1,2}, Анохин К.В.^{1,3}

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

²ФГБУ НИЦ Курчатовский Институт, Москва, Россия;

³ФГБНУ НИИ нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Москва, Россия

osrogozhnikova@gmail.com

В данной работе мы провели регистрацию кальциевой активности базолатеральной миндалины и СА1 гиппокампа при формировании у мышей нормальной памяти и памяти, нарушенной при реконсолидации введением блокатора синтеза белка (циклогексимида) в задаче усиления памяти при предэкспозиции к контексту.

Регистрацию кальциевой активности исследуемых структур проводили методом оптоволоконной фотометрии флуоресцентной активности кальциевого сенсора NCaMP7. После операции по вживлению оптоволокон проводили обучение мышей, помещая их в новую обстановку на 5 минут. На следующий день в этой же обстановке животным немедленно подавали электрокожное раздражение лап (1,5 мА, 2 с) и сразу возвращали их в домашние клетки. За 30 минут до этого внутрибрюшинно вводили циклогексимид (95 мг/кг) и физраствор группам «Циклогексимид» и «Физраствор», соответственно. Тестирование памяти проводили через сутки, помещая мышей в знакомую обстановку на 5 минут. Полученные данные изменения кальциевого сигнала анализировали по количеству зарегистрированных пиков, величине средней амплитуды пика и динамике кальциевого сигнала в моменты замирания животных.

Мы показали, что уровень замирания мышей обеих групп при тестировании памяти был значимо больше, чем при первичном обследовании обстановки. Однако мыши группы «Циклогексимид» замирали значимо меньше, чем мыши контрольной группы. Нами не было обнаружено изменений по количеству зарегистрированных пиков и величине амплитуды пика кальциевой активности базолатеральной миндалины и поля СА1 гиппокампа в каждой сессии эксперимента. При первом обследовании обстановки мы обнаружили рост кальциевой активности миндалины в группе «Циклогексимид» и поля СА1 гиппокампа в группе «Физраствор» после начала акта замирания мыши. Однако при тестировании памяти в моменты замирания животного активность миндалины значимо не отличалась у мышей двух групп, а активность поля СА1 увеличилась в группе «Физраствор» на фоне снижения активности у мышей группы «Циклогексимид».

Таким образом, нами были показаны изменения суммарной кальциевой активности нейронов гиппокампа и миндалины при совершении животными актов замирания. Однако нами не было выявлено значимого различия в данных ответах гиппокампа и миндалины при извлечении нормальной и нарушенной при реконсолидации памяти.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 20-15-00283 и междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».



ВЛИЯНИЕ СВЕРХЭКСПРЕССИИ 5-HT₇ РЕЦЕПТОРА В СРЕДНЕМ МОЗГЕ НА ДЕПРЕССИВНОПОДОБНОЕ ПОВЕДЕНИЕ И СЕРТОНИНОВУЮ СИСТЕМУ МОЗГА У МЫШЕЙ

Родный А.Я., Ильчибаева Т.В., Базовкина Д.В., Куликова Е.А., Науменко В.С.

ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

aleksandr1994rodny@gmail.com

Значительная полифункциональность серотонина (5-HT), классического нейромедиатора головного мозга, во многом обусловлена разнообразием его рецепторов. Многочисленные исследования серотониновой системы мозга выявили участие 5-HT рецепторов в регуляции различных типов нормального и патологического поведения и широкого ряда физиологических процессов.

Особое внимание научного сообщества привлекают 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторы, играющие важную роль в ауторегуляции серотониновой системы. Исследования последних лет указывают на важную роль гетеродимеризации серотониновых 5-HT₇ и 5-HT_{1A} рецепторов в механизмах депрессии и действия антидепрессантов (АД). Известно, что 5-HT_{1A} и 5-HT₇ рецепторы способны образовывать гомо- и гетеродимерные комплексы. Основное скопление 5-HT_{1A} рецепторов локализовано в ядрах шва среднего мозга, где они угнетают спайковую активность нейронов и снижают секрецию серотонина в синаптическую щель. Было высказано предположение, что одной из причин депрессивных расстройств является сдвиг соотношения между гомодимерами 5-HT_{1A}/5-HT₇ и 5-HT_{1A}/5-HT_{1A} в пресинаптических нейронах в сторону гомодимеров 5-HT_{1A}/5-HT_{1A}. Исходя из этого, искусственно увеличив количество 5-HT₇ рецепторов в пресинаптических окончаниях, можно ожидать восстановление физиологического соотношения гомо-/гетеродимеров, что приведет к АД эффекту.

Мы подтвердили эту идею, показав, что сверхэкспрессия 5-HT₇ рецептора с помощью аденоассоциированного вируса в области ядер шва среднего мозга вызывает АД эффект в тесте принудительного плавания у мышей C57BL/6J и генетически предрасположенных к депрессивно-подобному поведению мышей ASC/Icg (Antidepressant Sensitive Cataleptics). Эти эффекты сопровождалась повышенным уровнем мРНК рецептора 5-HT₇ в префронтальной коре мозга C57BL/6J и его снижением в гиппокампе мышей ASC. Важно отметить, что сверхэкспрессия рецептора 5-HT₇ приводила к снижению уровня рецептора 5-HT_{1A} в мембранной белковой фракции из образцов среднего мозга мышей C57BL/6J, но не у мышей ASC. Сверхэкспрессия рецептора 5-HT₇ вызвала увеличение соотношения 5-HT_{1A}/5-HT в среднем мозге и гиппокампе C57BL/6J и во всех исследованных структурах мозга мышей ASC.

Таким образом, сверхэкспрессия рецептора 5-HT₇ в области ядер шва влияет на серотониновую систему мозга и оказывает антидепрессивный эффект как у C57BL/6J, так и у «депрессивных» мышей ASC. Описанные результаты согласуются с нашим предположением о роли гетеродимеризации 5-HT_{1A}/5-HT₇ в регуляции депрессивного поведения.



ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ СЫВОРОТКИ КРЫС В ДИНАМИКЕ ЛЕЧЕНИЯ ОЖГОВОЙ РАНЫ ГИДРОГЕЛЕВЫМ МАТЕРИАЛОМ НА ОСНОВЕ ДЕРМЫ

Русинова Т.В.¹, Чупрынин Г.П.^{1,2}, Козлова А.А.¹, Мелконян К.И.¹

¹ФГБОУ ВО Кубанский государственный медицинский университет Минздрава России,
Краснодар, Россия;

²ФГБОУ ВО Кубанский государственный университет, Краснодар, Россия

rusinova.tv@mail.ru

В настоящее время разрабатывается большое количество биосовместимых гидрогелей для лечения ожоговых ран на основе природных полимеров. Одним из перспективных материалов для их создания является коллаген, обладающий способностью к адгезии и организации в раневом ложе. Кроме того, молекулы коллагена в составе гидрогелей расщепляются матриксными металлопротеиназами, имеющимися в раневом экссудате, до пептидов, которые способны активировать клетки иммунной системы в месте повреждения за счет активации паттерн-распознающих рецепторов. Целью данного исследования была оценка динамики изменения концентрации цитокинов при лечении ожоговых ран после применения гидрогелевого материала на основе дермы.

Исследование было проведено на сыворотке крыс породы Сфинкс массой 160-200 г возрастом 3-4 месяца (n=30). Всем животным была нанесена ожоговая рана диаметром 3 см с помощью металлической пластины, нагретой до 100°C. Крысы были разделены на две группы: группа 1 – без лечения, или контрольная группа (n=15), группа 2 – лечение разработанным гидрогелевым материалом на основе дермы, или опытная группа (n=15). Раны крыс групп 2 и 3 обрабатывали препаратами в объёме 0,3 г каждый день до 7-го дня эксперимента включительно. Образцы крови забирались до эксперимента, на 3, 7 и 14 сутки эксперимента для проведения иммуноферментного анализа на содержание IL1 α , IL8, IL4, IL6, IL10, TNF α , IGF, PDGF, VEGF и TGF.

Результаты исследования показали, что в группе крыс, которых лечили гидрогелевым материалом на 3 и 7 сутки эксперимента значительно повышаются значения показателей факторов роста PDGF, VEGF и TGF, по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о более активных репаративных процессах, неоангиогенезе и коллагеногенезе в сайте воспаления. Также продукты метаболизма коллагена в группе 2 оказывали регуляторное воздействие на синтез провоспалительных факторов IL1 α , IL8 и IL6, возвращая значения их концентраций к исходному уровню на 7 сутки эксперимента, тогда как в контрольной группе это наблюдалось только на 14 сутки. Не было выявлено статистических различий между группами в отношении концентрации IL10, которая значительно возрастала к 7 суткам эксперимента, кроме того не было зарегистрировано динамики изменений содержания TNF α для исследуемых групп.

В результате проведенного эксперимента было выявлено, что на ранних этапах заживления ожоговой раны гидрогелевый материал на основе дермы способствует оптимизации репаративных процессов и участвует в регуляции воспаления.



ПРОСТРАНСТВЕННАЯ МАСКИРОВКА В СЛУХОВЫХ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛАХ ЧЕЛОВЕКА

Саликова Д.А., Петропавловская Е.А., Шестопалова Л.Б.

ФГБУН Институт физиологии им. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия

salikovaDA@infran.ru

Маскировкой называется явление, заключающееся в ухудшении восприятия одного звука (тестового/маскируемого сигнала) в присутствии другого звука (маскера). Влияние маскера на воспринимаемые характеристики маскируемого сигнала зависит от способности слуховой системы разделять информацию, приходящую одновременно от разных источников. С помощью метода вызванных потенциалов можно зарегистрировать суммарную нейрональную активность, вызванную сигналами, заданными экспериментально. Целью исследования являлось изучение вызванных потенциалов (ВП) мозга человека в условиях пространственной маскировки некоррелированных шумовых сигналов.

Испытуемым (N=18) в ходе записи ЭЭГ при пассивном прослушивании предъявляли стационарный маскер и тестовые сигналы, пространственное положение которых задавалось при помощи интерауральных различий по интенсивности. Маскер мог находиться как по центру головы, так и латерально с обеих сторон. В тестовом сигнале, состоящем из последовательно предъявляемых стационарного участка и движущейся части, анализировали ВП в реакции на первый (неподвижный) фрагмент. Тестовые сигналы могли звучать как на фоне маскера, так и в тишине. Начало сигнала было отсрочено от включения маскера.

Исследовалась зависимость компонентов ВП от углового разнесения сигнала и маскера. Предъявление сигнала на фоне маскера приводило к заметному снижению амплитуды и увеличению латентности компонентов N1 и P2 по сравнению с обособленным предъявлением. Увеличение амплитуды и уменьшение латентности волн N1 и P2 при увеличении углового расстояния между сигналом и маскером от 0 до 90 град интерпретировалось как проявление феномена пространственного освобождения от маскировки. Последующее увеличение углового расстояния между латерализованным сигналом и маскером не показало нарастания освобождения от маскировки. В отличие от латентности, амплитуда ВП оказалась более чувствительной к угловому разнесению сигнала и маскера. Полученные данные указывают на то, что механизмы пространственной маскировки функционируют уже на предсознательном этапе анализа сложных слуховых сцен.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00033.



ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ СВЕТОВОГО ДНЯ НА МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6

Северюхина М.С.^{1,2}, Федотова А.Ю.^{1,2}

¹ФГБОУ ВО Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушино, Россия;

²ГНЦ ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. Шемякина и
Овчинникова РАН, Пушино, Россия

sms21111998sms@gmail.com

Введение. Циркадный ритм представляет собой ритм сна и бодрствования у живых организмов. Циркадные ритмы формировались и изменялись эволюционно в ряду поколений в зависимости от условий окружающей среды.

Цель работы. Проследить влияние изменения длительности светового дня на нарушение циркадных ритмов в контролируемых условиях среды на мышах линии C57BL/6.

Материалы и методы. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды: температура 20-24°C, относительная влажность 30–70%, 12-часовой цикл освещения (08:00-20:00 – «день», 20:00-08:00 – «ночь»). Мыши располагались по 1 особи в клетках Тип-2 (364 кв. см). Мыши были разделены на две группы: группа 1 – контроль (животные, содержащиеся в стандартных условиях, n=10), группа 2 – опытная (животные с нарушением циркадных ритмов, n=14). Всех животных еженедельно взвешивали. В течение трех недель обе группы содержались в одинаковых условиях. С четвертой недели группа 2 была переведена на постоянное освещение. Через две недели проводили глюкозотолерантный тест. Определяли количество глюкозы в крови натощак и после внутрибрюшинного введения раствора глюкозы в дозе 2 мг/кг через 0, 15, 30, 60, 120 мин. Через 6 недель животных подвергли некропии. Перед проведением некропии определяли базовый уровень глюкозы. При проведении некропии у всех животных забирали кровь для биохимического анализа, взвешивали внутренние органы.

Результаты. Достоверных изменений массы тела у группы 2 при постоянном освещении до 4 недели и к концу эксперимента не было, но относительно исходных значений масса в группе 2 отличается. Концентрация глюкозы у животных из группы 2 была повышена и наблюдалась толерантность к глюкозе. При биохимическом анализе крови было обнаружено пониженное количество мочевины и аланинаминотрансферазы, и повышенное количество щелочной фосфатазы и липопротеинов низкой плотности.

По результатам некропии, было обнаружено, что масса семенников, почек достоверно меньше во второй группе относительно контрольной, а масса легких и жировой ткани, окружающей придатки семенников, во второй группе достоверно выше, чем в первой.

Выводы. При изменении длительности светового дня у животных нарушаются циркадные ритмы, что способствовало нарушению метаболических процессов и привело к развитию толерантности к глюкозе, нарушению развития и работы многих органов.



РОЛЬ СИНУКЛЕИНОВ В РЕДОКС СИГНАЛЕ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

Серёгина Е.С.¹, Уколова П.А.¹, Палалов А.А.¹, Чапров К.Д.^{2,3}, Дунаев А.В.¹

¹ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия;

²ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия;

³ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия

e.s.seryogina@gmail.com

Синуклеины (альфа-, бета- и гамма-) представляют собой семейство высококонсервативных белков, специфичных для позвоночных, которые концентрируются в пресинаптических терминалях нейронов и, как считается, участвуют в регуляции везикулярного высвобождения, рециркуляции нейротрансмиттеров и активности АТФ-синтазы. До настоящего времени нормальные функции синуклеинов остаются до конца невыясненными. Учитывая, что патологическая форма альфа-синуклеина (являющегося одним из маркеров патологии при болезни Паркинсона) вовлечена в увеличение производства активных форм кислорода (АФК), важной является задача определения механизмов влияния синуклеинов на редокс баланс в тканях и клетках организма.

Используя флуоресцентный зонд Dihydroetidium в острых срезах головного мозга мышей с генетической инактивацией различных комбинаций генов, кодирующих члены семейства (нокаут бета- и альфа-/гамма-синуклеинов), была измерена скорость продукции АФК.

В астроцитах коры головного мозга скорость генерации АФК зависима от бета-синуклеина и в его отсутствие превышает контрольные значения в 2 раза. В нейронах коры головного мозга наоборот присутствие только бета-синуклеина повышает скорость в 1,5 раза. Однако, в среднем мозге регуляция происходит за счет альфа- и гамма-синуклеинов, что следует из увеличения скорости генерации АФК на 50% у группы с инактивированным бета-синуклеином. Уровень восстановленного глутатиона во всех группах соответствует контрольным значениям, что говорит о том, что повышенная продукция АФК в клетках экспериментальных групп не приводит к окислительному стрессу, а по-видимому, вовлечена в редокс сигнал.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1877.



СРАВНЕНИЕ ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЭЛЕКТРОСУДОРОЖНОЙ ТЕРАПИИ КОРОТКИМИ И УЛЬТРАКОРОТКИМИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМИ ИМПУЛЬСАМИ

Сизов С.В.

ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И. Разумовского Минздрава РФ, Саратов, Россия

sizovsv@yahoo.com

В последние годы в практику внедрены аппараты для электросудорожной терапии (ЭСТ) с ультракороткой – менее 0,5 мс, – длительностью электрического импульса, в т.ч. отечественного производства. Считается, что с уменьшением длительности импульса уменьшается выраженность побочных эффектов ЭСТ.

Цель исследования: сравнение изменений артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) у пациентов с приступообразно-прогредиентной шизофренией при ЭСТ короткими (длительностью 1,0 мс) и ультракороткими (длительностью 0,2 мс) импульсами.

Материалы и методы. 88 пациентов психиатрического стационара, страдающих приступообразно-прогредиентной шизофренией, проходили курс ЭСТ, который предусматривал 8 сеансов в течение 4 недель (2 раза в неделю). ЭСТ проводилась с помощью аппарата «ЭСТЕР» производства ООО «ТРИМА» (г. Саратов).

Во время сеанса ЭСТ регистрировались АД и ЧСС по кардиомонитору (перед вводом пациента в наркоз; максимальные, или «пиковые», значения при проведении электрического воздействия; после выхода пациента из наркоза).

Результаты. Обнаружены различия пикового АД под влиянием ЭСТ. Пиковое диастолическое АД было значимо выше в группе пациентов, получавших короткоимпульсную стимуляцию: $102,02 \pm 1,92$ мм рт.ст. против $96,2 \pm 1,46$ мм рт.ст. в группе пациентов, получавших ультракороткоимпульсную стимуляцию.

Отмечены различия в динамике АД в течение курса ЭСТ (от 1-го к 8-му сеансу). Пиковое *систолическое* АД в группе ЭСТ короткими импульсами имеет прирост в среднем на 9,01 мм рт.ст. больше, чем в группе ЭСТ ультракороткими импульсами. Пиковое *диастолическое* АД в группе ЭСТ короткими импульсами имеет прирост в среднем на 2,88 мм рт.ст. больше, чем в группе ЭСТ ультракороткими импульсами. Указанная тенденция отражается и на фоновом АД: диастолическое АД перед вводом в наркоз в группе ЭСТ короткими импульсами показало рост на 2,16 мм рт.ст. больше, чем в группе ЭСТ ультракороткими импульсами.

Выявлены статистически значимые различия по ЧСС в зависимости от длительности электрического импульса. ЧСС после выхода из наркоза у пациентов, получавших короткоимпульсную стимуляцию, значимо выше, нежели у пациентов, получавших ультракороткоимпульсную стимуляцию: $113,9 \pm 2,0$ и $105,6 \pm 1,6$ уд/мин соответственно.

Выводы. ЭСТ ультракороткими импульсами вызывает менее выраженную гемодинамическую реакцию, что имеет практическое значение для повышения уровня безопасности метода, особенно при наличии у пациента сопутствующей сердечно-сосудистой патологии.



РЕГИСТРАЦИЯ АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЫ КРЫСЫ *IN VIVO* С ПОМОЩЬЮ МЕТОДИК ЛОКАЛЬНОЙ ФИКСАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА И СУПЕРФУЗИОННОЙ КАМЕРЫ

Силаева В.М., Шумкова В.В., Ситдикова В.Р., Минлебаев М.Г.

ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

8.oktarina@gmail.com

Введение. Внутриклеточная регистрация электрической активности является «золотым стандартом» для описания поведения возбудимых клеток в физиологических и патологических условиях. Несмотря на то что методика локальной фиксации потенциала (patch clamp) ведет свою историю с прошлого века, она до сих пор широко используется в нейрофизиологии. Внутриклеточная регистрация *in vitro* является хорошо отработанной процедурой, однако использование patch clamp в *in vivo* условиях остается крайне сложной и мало распространенной методикой. В настоящей работе мы демонстрируем, что комбинация суперфузионной камеры (ранее нами запатентованной) позволяет облегчить проведение patch clamp регистраций *in vivo*.

Материалы и методы. Для реализации поставленной задачи мы провели серию экспериментов на крысах линии Wistar возраста P15–P30. Область неокортекса над соматосенсорной корой освобождалась от костей черепа. Для снижения пульсаций коры больших полушарий мы использовали прижимное устройство, которое имеет вид прозрачной сеточки с множеством отверстий диаметром 300 мкм каждое. Открытая поверхность неокортекса постоянно перфузировалась раствором искусственной цереброспинальной жидкости физиологической температуры (ACSF). Для регистрации активности отдельных клеток использовались стеклянные микропипетки с сопротивлением 4–8 МОм, заполненные раствором CsGluc (для внутриклеточной регистрации токов проходящих через мембрану клетки) или раствором ACSF (с 1мкМ ГАМК, для регистрации ГАМК активируемых хлорных каналов в cell-attached конфигурации). Поиск клетки осуществлялся слепым методом.

Результаты. Полученные результаты показали, что суперфузионная камера с прижимным устройством позволяют эффективно снизить физиологические пульсации головного мозга и провести регистрацию активности отдельных нейронов с помощью методики локальной фиксации потенциала.

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ ВО ВРЕМЯ ЭПИЛЕПТИФОРМНОЙ АКТИВНОСТИ В ЗРЕЛОМ МОЗГЕ КРЫСЫ *IN VIVO*

Ситдикова В.Р.¹, Силаева В.М.¹, Шумкова В.В.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия;

²Средиземноморский институт нейробиологии (INMED) при Национальном институте здоровья и медицинских исследований, Марсель, Франция

sitdikovavita@gmail.com

Эпилепсия – одно из самых распространенных заболеваний нервной системы, характеризующееся повторными судорожными приступами, возникающими в результате



генерации массивного гиперсинхронного электрического разряда большой группы нейронов головного мозга. На сегодняшний день известно, что во время эпилептиформной активности наблюдается увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора, что может привести к изменению полярности функции ГАМК с тормозной на возбуждающую. Данные результаты были получены в *in vitro* исследованиях, однако вопрос того будет ли данный феномен повторяться в *in vivo* условиях остается открытым.

Чтобы ответить на данный вопрос была проведена регистрация внутри- и внеклеточной активности в условиях *in vivo*. Использовались крысы линии Wistar от P18 до P26 дней после рождения, где P0 является днем рождения крысы. Эпилептиформная активность вызывалась локальной инъекцией 4-аминопиридина (100 мМ) на глубине 500-1000 мкм от поверхности мозга. В ходе работы оценивался мембранный потенциал покоя клетки и потенциал реверсии для ГАМК как в контроле, так и во время эпилептиформной активности.

Благодаря внеклеточной регистрации нейронной активности определялись периоды эпилептиформной активности. Анализ внутриклеточных записей показал, что в контрольных условиях мембранный потенциал регистрируемых нейронов составлял $-53,35 \pm 9,29$ мВ, а потенциал реверсии ГАМК был $-60,20 \pm 10,33$ мВ, то есть ГАМК являлась гиперполяризующей. Во время эпилептической активности потенциал реверсии для ГАМК смещался в сторону более деполяризующих значений ($-32,68 \pm 0,29$ мВ). Также мы наблюдали увеличение значения мембранного потенциала до $-27,73 \pm 7,94$ мВ.

Наши предварительные результаты показывают, что в ходе эпилептиформной активности происходит сдвиг потенциала реверсии ГАМК в сторону более положительных значений, в связи с увеличением внутриклеточной концентрации ионов хлора, что согласуется с результатами *in vitro* исследований, продемонстрированных ранее. Однако мы также наблюдали значительную деполяризацию мембранного потенциала регистрируемой клетки. Таким образом, несмотря на смещение потенциала реверсии, ГАМК продолжает исполнять роль тормозного медиатора, так как ее потенциал реверсии остается более гиперполяризующим, чем мембранный потенциал покоя. Вместе с тем, для более точного ответа на вопрос о роли ГАМКергической передачи во время эпилептиформной активности необходимо проведение дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00225.

РОЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ И АТФ-АЗНОГО КОМПЛЕКСА МИТОХОНДРИЙ ПЕЧЕНИ КРЫС В РАЗВИТИИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Сотникова Л.Д., Крестинина О.В., Одинокова И.В., Крестинин Р.Р., Бабурина Ю.Л.

ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

byul@rambler.ru

Хроническое употребление алкоголя приводит к различным поражениям печени, и к образованию алкогольных болезней печени, таких как алкогольный стеатогепатит, фиброз и цирроз печени и в конечном счете приводящее к гепатоцеллюлярному раку. По данным многочисленных исследований, при хроническом употреблении алкоголя в первую очередь происходят изменения в митохондриях. Этанол-опосредованные изменения приводят к



существенным нарушениям в функционировании систем окисления жирных кислот, цикла мочевины, окислительного фосфорилирования и генерации активных форм кислорода (АФК). Изучение митохондрий при хроническом алкогольном потреблении важно, так как алкоголь влияет на окислительно-восстановительные пути передачи сигналов и действует в качестве регулятора клеточного Ca^{2+} гомеостаза, т.к. изменение регуляции Ca^{2+} клеточного гомеостаза вовлекается в механизмы клеточной гибели.

Целью настоящей работы является исследование изменений, происходящих в системе функциональных комплексов дыхательной цепи и АТФ-азного комплекса митохондрий печени крыс при хроническом воздействии этанола. В экспериментах использовалась методика содержания и кормления крыс по модели Lieber-DeCarli с применением коммерчески доступных смесей для приготовления жидкого питания. Эта модель проста в применении и позволяет добиться потребления алкоголя животными в высоких дозах. Было показано, что скорость генерации АТФ в ходе окислительного фосфорилирования в митохондриях крыс, подверженных хронической алкогольной интоксикации, достоверно и значительно повышается. Также мы показали изменение уровней экспрессии и активности белков внутренней мембраны (комплексы дыхательной цепи и АТФазы). Так, нами было показано снижение активности комплексов I, III и IV на 30-40%, а АТФ-азного комплекса V более чем в два раза по сравнению с контрольными животными. Уровень экспрессии субъединиц белков, входящих в функциональные комплексы также существенно и достоверно снижался в митохондриях крыс опытной группы (подвергнутых этанольной интоксикации). Таким образом, угнетение экспрессии и повреждение белков важнейших функциональных комплексов митохондрий лежат в основе патологических процессов, связанных с употреблением алкоголя. Полученные данные позволяют приблизиться к пониманию патологических изменений, протекающих при хронической алкогольной интоксикации

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-015-00072 и № 20-04-00131

ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПОКСИЯ, КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ НИКОТИНОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Стратиллов В.А.¹, Ветровой О.В.^{1,2}, Тюлькова Е.И.¹, Ломерт Е.В.³

¹ФГБУН Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

stratilov.v@infran.ru

Основная проблема нейробиологии аддикций заключается в отсутствии понимания причин широкой вариабельности индивидуальной предрасположенности к зависимостям. Накоплен существенный массив информации о наследственных факторах риска развития аддикций, однако до сих пор не сформирована цельная картина представлений о влиянии факторов внешней среды, особенно в период перинатального онтогенеза.

Клинические данные и результаты экспериментальных исследований на животных показывают влияние стресса матери, сопровождающегося выбросом эндогенных глюкокортикоидных гормонов, а также патологий плаценты на дальнейшее физическое и когнитивное развитие потомства. Гипоксия является одной из наиболее распространенных форм пренатального стресса.



В поведенческих тестах нами было выявлено, что пренатальная гипоксия (ПГ), предъявляемая на 14-16 сутки гестации, является фактором риска для развития никотиновой зависимости у крыс. В попытке найти объяснение аддиктивному поведению ПГ крыс нами ранее также было проанализировано количество фосфорилированного по 34 треониновому остатку белка DARPP-32 (pThr34DARPP-32) в NAc. Обнаруженное увеличение доли pThr34DARPP-32 невозможно было объяснить изменениями в количестве дофамина и его рецепторов в NAc.

Изменения паттерна фосфорилирования белка DARPP-32 позволяют предположить ослабление глутаматергической стимуляции нейронов NAc, осуществляемой, в том числе, проекциями вентрального гиппокампа, в котором ранее нами было обнаружено ослабление глюкокортикоид-зависимой транскрипции генов метаболизма глутамата. Другим потенциальным объяснением может служить изменение экспрессии гена *chrna7* в структурах мезокортикального тракта, в том числе в префронтальной коре и VTA, в которой также было обнаружено увеличение VGluT2-позитивных глутаматергических терминалей. Факт преимущественного расположения nAChR7 на пресинапсах глутаматергических проекций к указанным структурам дает основание полагать, что причиной измененного никотинового аддиктивного поведения ПГ крыс являются, прежде всего, нарушения в транскрипции генов метаболизма глутамата и рецепторов ацетилхолина.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ No 19-315-90003.

ВЛИЯНИЕ АЛЬФА-СИНУКЛИНА НА ПОВЕДЕНЧЕСКИЙ ФЕНОТИП МЫШЕЙ

Суханова Ю.С.^{1,2}, Гринева А.С.¹, Лысикова Е.А.^{1,3}, Чапров К.Д.^{1,3,2}

¹ФГБУН Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка, Россия;

²ФГАОУ ВО Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
Белгород, Россия;

³ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

sukhanova.js@gmail.com

Белки синуклеины (альфа-, бета- и гамма-) играют важную роль в функционировании нервной системы. Исторически первым был открыт альфа-синуклеин и остается самым изученным членом данного семейства в связи с его участием в развитии ряда заболеваний: болезнь Паркинсона, хроническая алкогольная зависимость и т. д. Напрямую белок участвует в процессе выброса нейромедиаторов в синаптическую щель и влияет на слияние везикул с пресинаптической мембраной. Несмотря на способность синуклеинов компенсировать функции друг друга, недостаток или присутствие одного альфа-синуклеина способны повлиять на работу дофаминергической системы, вызывая изменения на поведенческом уровне.

Для изучения роли альфа-синуклеина в формировании поведенческих реакций использовали линии мышей с одиночным нокаутом гена альфа-синуклеина (A-KO) и двойным нокаутом бета- и гамма-синуклеина (BG-KO) в сравнении с тройным нокаутом (ABG-KO), и контрольными мышами линии C57Bl/6J без модификаций генома (WT). Самцы в возрасте 13 месяцев были протестированы в стандартных когнитивных тестах: «Открытое поле»,



«Распознавание нового объекта», «Y-образный лабиринт», «Водный лабиринт Морриса», «Приподнятый крестообразный лабиринт», «Принудительное плавание».

В тесте «Открытое поле» мыши А-КО, ВG-КО и АВG-КО проявили повышенную двигательную активность, а А-КО мыши проводили в центре арены значительно больше времени, чем остальные. В тесте «Распознавание нового объекта» различий между группами выявлено не было, однако АВG-КО мыши проводили равное количество времени с обоими объектами, что может свидетельствовать о наличии слабых нарушений долговременной памяти. В тесте «Y-образный лабиринт», мыши А-КО и WT проявляли одинаковую двигательную активность, в то время как ВG-КО и АВG-КО были гиперактивны. В тесте «Водный лабиринт» А-КО мыши быстрее остальных групп обучались находить скрытую под водой платформу, развивая при этом большую скорость. В тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: АВG-КО и ВG-КО группы сохраняли наибольшую двигательную активность, демонстрируя при этом снижение тревожно-подобного поведения, характеризующееся частотой выходов и временем в открытых рукавах лабиринта. Тест «Принудительное плавание» показал снижение времени активного плавания для АВG-КО, свидетельствующее о наличии депрессивно-подобного поведения.

Подводя итог, альфа-синуклеин влияет как на процессы формирования долговременной памяти, так и на двигательную активность мышечных волокон в открытом пространстве и проявление тревожно-подобного поведения.

Финансирование: грант РФФИ № 22-24-00995 и стипендия СП-547.2022.4.

УМЕРЕННАЯ ГИПОБАРИЧЕСКАЯ ГИПОКСИЯ МОДУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ Na,K-АТФазы И ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ КРЫСЫ

Тишкова М.В., Кулишенко А.А., Ганке Д.Д.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

mariiatiskova@gmail.com

Активность Na,K-АТФазы играет ведущую роль в поддержании электрогенеза, возбудимости и сократительной функции скелетных мышц, содержащих основной пул Na,K-АТФазы организма млекопитающих. Снабжение кислородом клеток и тканей имеет первостепенное значение для их жизнедеятельности. В скелетной мышце длительная гипоксия вызывает существенные функциональные нарушения, включая дыхательную дисфункцию после COVID-19. В то же время гипоксическое прекодиционирование может оказывать защитные эффекты при различных функциональных нарушениях, в том числе при дисфункции диафрагмы – главной респираторной мышцы. Na,K-АТФаза рассматривается в качестве основного фактора адаптации к гипоксии. Влияние разных форм гипоксии на Na,K-АТФазу скелетной мышцы требует дальнейшего изучения.

В этом исследовании мы проверили нашу гипотезу, что умеренная гипоксия способна модулировать Na,K-АТФазу, и, таким образом, оказывать влияние на электрогенез мышечных волокон. Крыс подвергали гипобарической гипоксии, соответствующей подъему на высоту 3000 м над уровнем моря, в течение 3 час с использованием барокамеры Tabay V-18. Контрольные животные помещались в работающую барокамеру на тот же временной период,



но без герметизации и создания гипоксии. Опыты проводили на изолированных диафрагмальных мышцах через 3 час после извлечения крыс из барокамеры. С помощью стандартной микроэлектродной техники регистрировали мембранный потенциал покоя (МПП) во внесинаптической области мышечных волокон. После гипоксического воздействия наблюдалась гиперполяризация сарколеммы: в контрольной группе среднее значение МПП составило -77.8 ± 0.2 мВ, тогда как в опытной группе величина МПП достигала -82.0 ± 0.4 мВ, таким образом, гиперполяризация составила 4.2 мВ ($p < 0.01$). С помощью специфического блокатора Na,K-АТФазы убаина в концентрации 500 мкМ, полностью блокирующей активность фермента, определяли электрогенный вклад Na,K-АТФазы в наблюдаемый эффект. Оказалось, что электрогенный вклад Na,K-АТФазы достоверно увеличился до -20.1 ± 0.8 мВ в опытной группе животных по сравнению с контрольной группой (-16.1 ± 0.7 мВ, $p < 0.01$). Таким образом, можно предположить, что гиперполяризация сарколеммы, вызываемая умеренной гипобарической гипоксией, возникает за счет повышения электрогенной активности Na,K-АТФазы. Обсуждается возможное профилактическое значение полученных результатов в условиях нарушения мышечного электрогенеза при мышечной дисфункции.

Работа поддержана грантом РФФИ 18-15-00043.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ЧЕРНОЙ СУБСТАНЦИИ МЫШИ, КАК НОВЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ИХ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Трошев Д.В.¹, Блохин В.Е.¹, Украинская В.М.², Колачева А.А.¹, Угрюмов М.В.¹

¹ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

²ГНЦ ФГБУН Филиал Института биоорганической химии им. Шемякина и Овчинникова РАН, Пушчино, Россия

dmitry.vad.troshev@gmail.com

В данном исследовании впервые разработан метод получения изолированной популяции дофаминергических нейронов (ДН) из черной субстанции (ЧС) взрослых животных. Актуальность изучения этих нейронов определяется тем, что они играют ключевую роль в регуляции моторного поведения, а их дегенерация приводит к развитию болезни Паркинсона (БП). Окрашивание ДН проводили по двум флуоресцентным маркерам: DRAQ5 и GBR-BP – специфическому красителю ДН. Нам не удалось выделить популяцию ДН при окрашивании клеточной суспензии ЧС 5 нМ GBR-BP из-за низкого уровня флуоресценции клеток. Этот показатель удалось существенно улучшить путем увеличения концентрации GBR-BP до 20 и 50 нМ, а самое главное – путем окрашивания ДН в вибраторных срезах ЧС до их клеточной диссоциации. Интенсивность флуоресценции ДН в суспензии в этом случае существенно возрастает за счет окрашивания GBR-BP не только тел нейронов, как это происходит в случае окрашивания клеточной суспензии целой ЧС, но и отростков ДН, что позволило выделить популяцию ДН и отсортировать ее. В работе представлены доказательства того, что отсортированные клетки являются ДН: (1) в этих клетках показана экспрессия генов белков-маркеров ДН – тирозингидроксилазы (ТГ), дофаминового транспортера (ДАТ) и декарбоксилазы ароматических L-аминокислот (ДАА); (2) в 95%



отсортированных клеток иммуногистохимически выявлена ТГ. Разработанный нами метод позволил также выделить популяцию ДН у мышей на модели БП, индуцированной введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина гидрохлорида. У этих нейронов проявились те же особенности экспрессии генов белков-маркеров ДН (ТГ, ДАТ), которые были нами обнаружены в целой ЧС. Разработанный нами метод получения изолированной популяции ДН ЧС открывает широкие перспективы для изучения молекулярных механизмов функционирования этих нейронов в норме и при патологии, которые недоступны для изучения в целой ЧС из-за ее клеточной гетерогенности.

Работа поддержана грантом Минобрнауки «Фундаментальные исследования нейродегенеративных заболеваний с позиции трансляционной медицины» № 13.1902.21.0027 / RF-190220X0027.

МОДУЛЯЦИЯ ФИБРОЗА ПОСЛЕ ИШЕМИИ/РЕПЕРФУЗИИ ПОЧКИ ОГРАНИЧЕНИЕМ КАЛОРИЙНОСТИ ПИТАНИЯ И КЕТОГЕННОЙ ДИЕТЫ

Тулаева Е.Р.¹, Бочарников А.Д.², Якупова Э.И.^{3,4}, Плотников Е.Ю.³

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ
(Сеченовский Университет), Москва, Россия;

³НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия;

⁴ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкино, Россия

tulaevaer@gmail.com

Хронические заболевания почек, как и острое ишемическое повреждение почек являются распространенной проблемой во многих странах. Оба состояния могут прогрессировать до терминальной стадии почечной недостаточности, характеризующейся развитием фиброза. На сегодняшний день доступные методы лечения фиброза ограничены. Т.о., существует потребность поиска новых терапевтических агентов для предотвращения прогрессирования фиброзного поражения почек.

Влияние на энергетический метаболизм организма может положительно воздействовать на патологические процессы. В частности, ограничение калорийности питания (ОКП) снижает ишемические повреждения практически всех органов, включая почки. Однако на данный момент неизвестно, как ОКП и КД влияют на развитие фиброза после ишемии/реперфузии (И/Р) почек.

Цель исследования – оценить возможность защиты почечной ткани от развития фиброзного поражения после И/Р с помощью ОКП или КД.

Для выполнения цели применялась модель 30-минутной унилатеральной И/Р, с последующей 4-недельной диетой: 35% ОКП или КД. Животные были поделены на 4 группы: (1) интактные мыши, (2) прооперированные мыши, (3) прооперированные мыши с последующей 35% ОКП или (4) КД.



В качестве оценки общего влияния диеты на организм измеряли разницу в весе животных в течение 4 недель. Было установлено повышение массы тела мышцей, находившихся на КД, и снижение в группе с ОКП (~10%, в обоих случаях). Также замерялось соотношение веса правой (интактной) и левой (ишемизированной) почек к 4-ой неделе. При этом разница в весе была больше в группе прооперированных мышцей без диеты и с КД, а в группе с ОКП была приближена к интактной группе. Что косвенно свидетельствует о большем фиброзном поражении в группах 2 и 4.

С помощью вестерн-блоттинга на такие маркеры развития фиброза как α -гладкомышечный актин (α -ГМА) и коллаген I было показано, что группа с ОКП имела незначительное снижение уровня коллагена и α -ГМА по сравнению с группой без диеты, и приближалась по этим показателям к интактной группе. В то же время группа с КД показала результаты, аналогичные ишемии без какой-либо диеты. При помощи гистохимической окраски пикропунцовым S также было показано, что отложения коллагена в группе с ОКП соответствует интактной группе, в то время как группа с КД и без диеты были на одном уровне.

Можно сделать вывод о том, что применение ОКП имеет некоторый антифиброзный эффект в модели И/Р почки, в то время как применение КД не оказывает положительного влияния.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта № 21-75-30009.

СУПЕРЭКСПРЕССИЯ МУТАНТНОГО БЕЛКА FUS ПРИВОДИТ К МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

Уколова П.А.¹, Микенькина М.А.¹, Солдатов М.О.², Винокуров А.Ю.¹

¹ФГБОУ ВО Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, Орел, Россия;

²ФГБОУ ВО Курский государственный медицинский университет Минздрава РФ,
Курск, Россия

polya.ukolova@andex.ru

Боковой амиотрофический склероз (БАС) – прогрессирующая патология нервной системы, характеризующаяся нарушением работы мышц (в том числе дыхательных) вследствие гибели моторных нейронов. По статистике, заболеваемость БАС в мире составляет 0,6-3,8 новых случая на 100 тыс. населения в год. Одним из признаков данной патологии является образование в цитоплазме мотонейронов агрегатов белка FUS.

Целью работы являлась оценка одного из важнейших интегральных биоэнергетических параметров – митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) и причин его изменения в клетках, экспрессирующих мутантную форму белка FUS.

Исследования выполняли на первичной нейроглиальной культуре, а также интактных митохондриях, полученных из мозга мышцей трансгенной линии с суперэкспрессией аберрантного гена человеческого белка FUS [1-359]. Оценку величины $\Delta\psi_m$ проводили методом конфокальной микроскопии (ZEISS LSM 900) с использованием в качестве



флуоресцентного зонда метилового эфира тетраметилродамина (TMRM). Полярографический метод с использованием электрода Кларка (измерительный комплекс Oxytherm+ System) применяли для определения параметров дыхания изолированных митохондрий в присутствии субстратов I и II комплексов ЭТЦ.

В результате исследований показано, что в клетках коры нейроглиальной культуры, полученной из мутантных животных, значение $\Delta\psi_m$ выше, а в клетках среднего мозга – ниже в сравнении с контролем. При этом характер вклада I комплекса ЭТЦ в поддержание $\Delta\psi_m$ существенно снижен и не восстанавливается после обработки клеток пируватом. В случае митохондрий, выделенных из мозга трансгенных животных, выявлено снижение скоростей потребления кислорода после внесения АДФ (V_3) и после его потребления (V_4), а также параметров дыхательного контроля (V_3/V_4) и АДФ/О в присутствии субстратов I комплекса ЭТЦ. Таким образом, ингибирование I комплекса ЭТЦ приводит к снижению величины $\Delta\psi_m$, которая поддерживается в основном за счет работы II комплекса.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075-15-2019-1877.

ВЛИЯНИЕ ГИПОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ НА БАРЬЕРНЫЕ СВОЙСТВА ЭПИТЕЛИЯ ТОЩЕЙ И ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫСЫ

Федорова А.А., Ливанова А.А.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

a.fedorova@spbu.ru

Поддержание барьерных функций кишечника играет важную роль в предотвращении множества патологических состояний. Нормальное функционирование эпителиальных барьеров обеспечивается комплексом белков плотных контактов, мозаика которых различается в тощей и толстой кишке, что определяет специфику барьерных свойств данных тканей. Показано, что в регуляцию барьерных свойств плотных контактов вовлечен VEGF-зависимый сигналинг, опосредованный активностью индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора HIF1. Однако специфика влияния гипоксии на барьерные свойства различных отделов кишки остается невыясненной.

Целью данного исследования было изучение раннего и отложенного влияния гипобарической гипоксии в режимах 540 и 360 мм рт. ст., что эквивалентно подъему на высоту 3000 и 6000 м над уровнем моря, соответственно (ГГ3000 и ГГ6000), на барьерные характеристики тканей тощей и толстой кишки крысы. Животных подвергали гипоксии в течение 3 ч с использованием барокамеры Tabay V-18. Через 3 и 24 ч после извлечения из барокамеры крыс декапитировали, фрагменты ткани тощей и толстой кишки помещали в камеру Уссинга для регистрации трансэпителиального сопротивления (ТЭС) и тока «короткого замыкания» (Ткз).

В тощей кишке ГГ3000 и ГГ6000 не вызывали изменений ТЭС, что указывает на отсутствие влияния данных режимов гипоксии на барьерные свойства. При этом, через 3 ч



после ГГ3000 и ГГ6000 происходило увеличение Ткз, но уже через 24 ч этот эффект нивелировался.

В толстой кишке через 3 ч после ГГ3000 происходило снижение ТЭС и увеличение Ткз с последующей нормализацией этих параметров через 24 ч. В то же время ГГ6000 вызывала стабильное снижение ТЭС и увеличение Ткз по крайней мере на протяжении 24 ч.

Таким образом, исследованные режимы гипоксии снижают барьерную функцию кишечника, причем преимущественно в толстой кишке. В то время как уменьшение ТЭС свидетельствует о нарушении функционирования белков плотных контактов и может быть объяснено описанным в литературе гипоксическим сигналингом, увеличение Ткз может отражать изменение активного транспорта, в частности, связанное с функционированием Na,K-АТФазы. Такое изменение барьерных свойств и коррелирующих с ними транспортных процессов может свидетельствовать о наличии функционального взаимодействия между белками плотных контактов и Na,K-АТФазой, расшифровка которого требует дальнейших исследований.

Работа поддержана грантом РФФ № 18-15-00043.

ПОТЕНЦИАЦИЯ ВЫЗВАННОЙ СЕКРЕЦИИ МЕДИАТОРА В НЕРВНО-МЫШЕЧНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ НА ФОНЕ ЭКЗОГЕННОЙ АППЛИКАЦИИ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ

Хоткина Н.А., Тарасова Е.О., Гайдуков А.Е., Балезина О.П.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

NatashaKhotkina@yandex.ru

Эндоканнабиноиды (ЭК) – хорошо известные ретроградные регуляторы синаптической активности, как правило, подавляющие секрецию нейромедиаторов в центральной нервной системе. Классическими ЭК являются анандамид (АЭА) и 2-арахидоноилглицерин (2-АГ), их действие подробно изучено в синапсах ЦНС. В периферических моторных синапсах млекопитающих исследование действия ЭК началось относительно недавно, и было выявлено их потенцирующее влияние на спонтанную секрецию АХ в этих синапсах. В связи с этим, целью данной работы было изучить влияние экзогенной аппликации АЭА и 2-АГ на вызванную секрецию медиатора в моторных синапсах мыши.

Эксперименты проводились на нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши с использованием стандартной микроэлектродной техники отведения биопотенциалов. Регистрировали залпы потенциалов концевых пластинок (ПКП) в ответ на стимуляцию диафрагмального нерва (50 Гц, 1 с), одновременно с регистрацией спонтанных миниатюрных потенциалов (МПКП). По полученным данным рассчитывали квантовый состав ПКП. Статистический анализ проводился в программе GraphPad Prism 6.0.

На фоне аппликации АЭА (30 мкМ) происходило увеличение амплитуды каждого ПКП в залпе примерно на 70%, при этом средняя амплитуда МПКП не менялась по сравнению с контролем. Увеличение амплитуды ПКП происходило за счёт соответствующего роста КС каждого ПКП в залпе, связанное с увеличением размера пула готовых к выбросу везикул.



Действие АЭА на секрецию ацетилхолина (АХ) полностью предотвращалось блокированием СВ1-рецепторов при помощи АМ 251.

На фоне действия 2-АГ (1 мкМ) также происходило увеличение амплитуды каждого ПКП в залпе, но при этом одновременно увеличивалась и амплитуда МПКП. КС ПКП в залпе оставался без изменений по сравнению с контролем. Данные эффекты аппликации 2-АГ не проявлялись на фоне действия блокатора СВ1-рецепторов АМ 251. Опираясь на то, что было показано, что потенциация спонтанной секреции АХ (проявляющаяся в виде прироста амплитуды МПКП) предотвращается везамиколом (1 мкМ), подавляющего накачку АХ в везикулы, можно предположить, что потенцирующее действие 2-АГ на вызванную секрецию медиатора связано с увеличением размера отдельного кванта АХ.

Таким образом, и АЭА, и 2-АГ способны оказывать потенцирующее действие на вызванную секрецию АХ в моторных синапсах мыши.

ВЛИЯНИЕ ЭНДОКАННАБИНОИДОВ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ ПЕРЕДАЧУ В НОВООБРАЗОВАННЫХ МОТОРНЫХ СИНАПСАХ МЫШИ

Чернышев К.А.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

cherkir2000@yandex.ru

Эндоканнабиноиды представляют собой липидные молекулы, синтезируемые в нейронах, глиальных и мышечных клетках, откуда могут высвободиться и оказывать влияние на пресинаптические окончания, действуя как ретроградные модуляторы синаптической передачи. У позвоночных были обнаружены два основных эндоканнабиноида: арахидоноилэтаноламид (АЭА) и 2-арахидоноилглицерин (2-АГ), а также два типа каннабиноидных рецепторов (СВ1 и СВ2). Воздействие эндоканнабиноидов на синапсы ЦНС активно изучается уже много лет, но об их влиянии на нервно-мышечные синапсы известно крайне мало, несмотря на описанные возможности синтеза и высвобождения эндоканнабиноидов из мышц. Роль же эндоканнабиноидной системы в регуляции синаптической передачи в функционально ослабленных, восстанавливающихся после травмы, моторных синапсах, оставалась полностью неизвестной. В данной работе исследовали влияние 2-АГ и АЭА на параметры спонтанной и вызванной секреции медиатора в новообразованных моторных синапсах мыши с использованием стандартного микроэлектродного метода отведения биопотенциалов.

2-АГ в новообразованных синапсах увеличивал амплитуду миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП), при этом не влияя на их частотные и временные характеристики. Кроме того, при стимуляции нерва в режиме коротких залпов (50 Гц, 1 с) 2-АГ увеличивал амплитуду потенциалов концевой пластинки (ПКП), оставляя квантовый состав ПКП неизменным. Полученные данные указывают на потенцирующую роль 2-АГ в новообразованных синапсах, что совпадает с его недавно обнаруженными эффектами в зрелых моторных синапсах мыши. Для выяснения, на какой именно тип каннабиноидных рецепторов действует 2-АГ, использовали обратный агонист СВ1-рецепторов АМ-251. В присутствии АМ-251 2-АГ утрачивал свое потенцирующее воздействие на выброс медиатора.



Применение АЭА в новообразованных синапсах не влияло на параметры МПКП, однако вызывало уменьшение амплитуды ПКП в коротких ритмических залпах и снижение их квантового состава. Причем такое его действие полностью предотвращалось предварительной инкубацией с АМ-251. Это свидетельствует о том, что эффекты АЭА в новообразованных синапсах также опосредованы активацией СВ1 рецепторов. Занимательно, что подавляющее действие АЭА в новообразованных моторных синапсах отличается и от эффектов, оказываемых им в зрелых синапсах. Механизмы таких разнонаправленных воздействий 2-АГ и АЭА на синаптическую передачу в регенерирующих после травмы моторных синапсах, безусловно, требуют дальнейшего изучения.

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА ДИСТАЛЬНЫХ ОТДЕЛОВ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У КРЫС В МОДЕЛИ ДИЕТ-ИНДУЦИРОВАННОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Чернышов Н.А., Бирулина Ю.Г., Мотлохова Е.А.

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава РФ,
Томск, Россия

nikitatchernischoff@yandex.ru

Актуальность. Патогенез сочетанной патологии метаболического синдрома (МС) и заболеваний органов дыхания в настоящее время до конца не изучен. Исследование жидкости бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ) для изучения влияния факторов МС на бронхолегочную систему на животных моделях позволяет выявить ранние изменения клеточного состава дистальных отделов дыхательных путей даже при отсутствии выраженных морфологических и функциональных изменений.

Цель – исследовать клеточный состав ЖБАЛ у крыс в модели диет-индуцированного МС.

Материалы и методы. Для моделирования МС использовали взрослых крыс-самцов линии Wistar (n=33), разделенных на контрольную (n=15) и опытную (n=18) группы. Модель МС воспроизводили путем содержания животных опытной группы на высокожировой и высокоуглеводной диете в течение 12 недель. Развитие у крыс МС констатировали на основании анализа массы тела, артериального давления, концентрации глюкозы в крови, изменения концентрации глюкозы в глюкозотолерантном тесте, показателей липидного спектра крови.

После эвтаназии животных выполняли бронхоальвеолярный лаваж открытым способом на изолированном комплексе сердце-легкие. Определяли общую клеточность пробы ЖБАЛ, затем жидкость центрифугировали, полученный осадок наносили на предметное стекло, фиксировали и окрашивали по методу Романовского-Гимзы. Подсчет клеточных элементов проводили при микроскопии не менее 200 клеток с использованием иммерсионного объектива. Результаты представляли в относительных единицах (% от общего числа лейкоцитов) и в абсолютных значениях ($\times 10^9/\text{л}$ (Г/л)) в виде медианы и квартилей (Me; Q₂₅-Q₇₅). Межгрупповые различия сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$ по критерию Манна-Уитни.



Результаты. При исследовании клеточного состава ЖБАЛ у животных опытной группы было выявлено статистически значимое увеличение общего количества лейкоцитов до 0,8 (0,65;1,55) Г/л, $p=0,047$) по сравнению с контрольной группой (0,55 (0,3;0,84) Г/л). В результате морфологического анализа клеточного состава лейкоцитов у крыс с МС наблюдалось увеличение как относительного, так и абсолютного числа альвеолярных макрофагов в среднем в 1,2 и 2,8 раза соответственно, абсолютного количества лимфоцитов (опыт: 0,05 (0,02;0,09) Г/л; контроль: 0,02 (0,01;0,04), $p=0,039$) и абсолютного числа нейтрофильных гранулоцитов (опыт: 0,58 (0,02;0,09) Г/л; контроль: 0,27 (0,14;0,36), $p=0,035$).

Выводы. Изменения качественного и количественного состава клеток дистальных отделов дыхательных путей могут свидетельствовать о развитии воспалительного процесса в бронхолегочной системе, который формируется на фоне системных метаболических нарушений при диет-индуцированном МС.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации (МК-3302.2022.1.4).

НЕСИМВОЛЬНАЯ МАТЕМАТИКА: ВЫЗВАННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ В ЗАДАЧЕ ВЕРИФИКАЦИИ ОТВЕТА

Шадрина А.А., Князева В.М

ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

aly.korostelyova@yandex.ru

Несмотря на существующие различия между двумя системами количественной оценки (символьной и несимвольной), между ними существуют определенные функциональные связи, а формирование счетных способностей у детей напрямую зависит от оперирования несимвольными объектами в дошкольном возрасте. Понимание взаимосвязей между символьной и несимвольной обработкой даст возможность создавать и использовать инструменты для работы с людьми, имеющими дискалькулию.

Цель исследования – определить особенности вызванных потенциалов (ВП) мозга человека при выполнении несимвольных арифметических операций. Регистрация электроэнцефалограммы производилась 32-канальным энцефалографом “Мицар-ЭЭГ-202” и “WinEEG” (ООО Мицар, Санкт-Петербург, Россия). В эксперименте использовались операции на сложение и умножение с группами точек. Примеры были, условно, разделены на малую проблему (МП – легко вычисляемые примеры) и большую проблему (БП – сложные примеры).

Для обработки были взяты усреднённые амплитуды ВП на интервалах длительностью ± 25 мс от максимальных значений пиков компонент N400 и LPC. Было установлено, что при выполнении несимвольных арифметических операций в ответ возникает компонент N400, отражающий процессы дополнительной семантической активации (сложение ($F(1,9) = 11,81$; $p = .007$); умножение ($F(1,9) = 11,38$; $p = .008$)). С другой стороны формирование компонента LPC, отражающего процессы контекстной интеграции и оценки неправдоподобности неверного ответа, наблюдается только при предъявлении примеров малой проблемы в задаче на сложение ($F(1,9) = 13,115$; $p = .006$), что может быть связано с более сильной интеграцией таких примеров в кортикальных сетях долговременной памяти.



Для анализа динамики распределения потенциала в ходе выполнения задания был проведен анализ различий между первым и третьим блоком. Амплитуда ВП N400 и LPC в теменных отведениях справа была значительно больше ($p < .001$). При изучении амплитуды ВП компонента N400 в блоках на сложение МП, амплитуда ВП на правильный ответ в первом блоке выше ($p = .005$), значительно в теменных отведениях. В блоках на сложение БП, амплитуда N400 на правильный ответ к 3 блоку увеличивается в правой латерализации ($p = .016$). В амплитуде компонента LPC, в зависимости от блока, можно обнаружить влияние факторов Ответ ($p = .003$) и Фронтальность ($p = .001$). В результате, можно говорить о наличии компонентов N400 и LPC для задач с несимвольной арифметикой.

ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ЦИТОСКЕЛЕТ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ КЛЕТОК ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ СЕТЧАТКИ ЧЕЛОВЕКА

Шафеев Е.В.¹, Кузнецова А.В.¹, Павлова А.В.², Куринов А.М.¹, Александрова М.А.¹

¹ФГБУН Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

elenashafei@gmail.com

Пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) играет важную роль в поддержании структуры сетчатки и обеспечении ее зрительной функции. Многие заболевания сетчатки связаны с нарушениями, при которых клетки ПЭС теряют свои эпителиальные и приобретают мезенхимные характеристики, становятся способными к миграции, пролиферации и трансдифференцировке. В настоящее время не существует эффективных подходов к восстановлению клеток ПЭС, но активно разрабатываются способы замедлить развитие патологии. Мелатонин является перспективной и безопасной молекулой для улучшения состояния офтальмологических больных, так как обладает антиоксидантным и антипролиферативным действием. Целью данной работы было изучение механизмов влияния мелатонина на клетки ПЭС человека *in vitro* с использованием линии ARPE-19.

Добавление физиологических концентраций мелатонина (50 нМ) в среду культивирования к неприкрепленным клеткам приводило к изменению цитоскелета клеток ARPE-19: увеличивалась площадь клеток по сравнению с контролем, клетки на периферии колоний приобретали отростки, стремясь создать контакт с соседними колониями. Данный эффект может быть связан с активацией адаптивных способностей ПЭС к восстановлению целостности клеточного слоя путём увеличения площади клеток без усиления пролиферации. Эффект зависел от того, были ли подвержены клетки контактному ингибированию и исчезал по мере снижения концентрации мелатонина в среде. При добавлении как физиологических, так и фармакологических (800 нМ) концентраций мелатонина к уже прикрепленным клеткам, образовавшим колонии, влияния на цитоскелет не наблюдалось.

Под действием как физиологических, так и фармакологических концентраций мелатонина происходило дозозависимое снижение уровня пролиферации клеток ПЭС, независимо от контактного ингибирования. Методом проточной цитометрии было выявлено увеличение количества клеток в S-фазе с увеличенным содержанием ДНК. Молекулярные исследования показали, что физиологические концентрации мелатонина подавляли экспрессию генов-маркеров дедифференцировки (*KLF4*) и нейральной дифференцировки (*TUBBIII*) и не влияли на экспрессию эпителиального маркера Cx43.



Таким образом, мелатонин способен оказывать антипролиферативное и стабилизирующее действие на клетки ПЭС, что в целом поддерживало сохранение эпителиального фенотипа. Однако необходимы дальнейшие исследования для выявления наиболее эффективных доз и времени воздействия, а также определения молекулярных механизмов, лежащих в основе действия мелатонина на клетки ПЭС.

НОРМОБАРИЧЕСКАЯ ГИПОКСИЯ У КРЫСЯТ В ВОЗРАСТЕ 10 ДНЕЙ НЕ ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЯМ В РЕГУЛЯЦИИ ТОНУСА СИСТЕМНЫХ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Хухарева Д.Д., Швецова А.А., Борзых А.А., Гайнуллина Д.К.

ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

dina.gaynullina@gmail.com

Нехватка кислорода может оказывать влияние на функционирование многих систем и органов, включая кровеносную систему. Однако до сих пор остаются практически неизученными острые эффекты нехватки кислорода на регуляцию тонуса системных кровеносных сосудов в раннем постнатальном онтогенезе. В то же время, согласно данным ВОЗ, организм в раннем онтогенезе может достаточно часто подвергаться гипоксическому воздействию, например, при тяжелом течении родов. Вместе с тем, необходимо отметить, что регуляция тонуса сосудов в раннем онтогенезе в значительной степени отличается от таковой во взрослом организме. Например, в артериях крысят в возрасте 10-15 дней по сравнению со взрослыми сильнее выражен просократительный вклад Rho-киназы и антиконстрикторное влияние Kv7 каналов и оксида азота (NO).

Для того, чтобы пролить свет на проблему острых эффектов гипоксии на кровеносные сосуды в раннем онтогенезе, мы моделировали нормобарическую гипоксию (8% O₂ в течение 2 часов при 37C) у крысят в возрасте 10 дней (контрольные крысята были помещены в аналогичную камеру с нормальным содержанием O₂), после чего у них сразу исследовали сократительные реакции артерий на агонист альфа1-адренорецепторов метоксамин в изометрическом режиме с использованием системы wire myograph (DMT). В качестве объекта исследований была выбрана подкожная артерия – сосуд мышечного типа, снабжающий кровью кожу плюсны и стопы.

Сократительные ответы подкожной артерии с интактным эндотелием на метоксамин (в диапазоне концентраций от 0.01 до 100 мкМ) не различались у контрольных крысят и крысят, подвергшихся нормобарической гипоксии. Для исследования вклада различных путей регуляции сокращения использовали ингибиторы Rho-киназы Y27632 (3 мкМ), NO-синтазы L-NNA (100 мкМ) и блокатор Kv7 каналов XE991 (3 мкМ). Влияние используемых ингибиторов/блокаторов в равной степени изменяло сократительные ответы на метоксамин у контрольных крысят и крысят, подвергшихся нормобарической гипоксии. Таким образом, нормобарическая гипоксия (8% O₂ в течение 2 часов) не вызывает «острых» изменений в регуляции тонуса системных артерий в раннем постнатальном периоде. В то же время нельзя исключить, что гипоксическое воздействие в период раннего онтогенеза может привести к развитию «отставленных» изменений в регуляции тонуса сосудов, что будет являться предметом дальнейших исследований.



TASK-1 КАНАЛЫ ОБЛАДАЮТ АНТИКОНСТРИКТОРНЫМ ВЛИЯНИЕМ В МЕЖДОЛЕВЫХ АРТЕРИЯХ ПОЧКИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО ВНЕКЛЕТОЧНОГО pH

Швецова А.А.¹, Лазаренко В.С.¹, Гайнуллина Д.К.¹, Тарасова О.С.¹, Шуберт Р.²

¹ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия;

²Институт теоретической медицины, Медицинский факультет, Университет Аугсбурга,
Аугсбург, Германия

anastasiashvetsova92@gmail.com

Цель. TASK-1 играют ключевую роль в регуляции тонуса легочных артерий, однако их вазомоторная роль в сосудах большого круга кровообращения мало изучена. Данная работа была направлена на проверку гипотезы о том, что (1) функциональный вклад TASK-1 каналов в регуляцию сокращения не одинаков в артериях разных сосудистых регионов, (2) что это связано с различиями в экспрессии TASK-1 канала и (3) увеличение pH внеклеточной среды приводит к увеличению антиконстрикторного влияния TASK-1 каналов в системных артериях. Таким образом, мы оценивали экспрессию TASK-1 каналов и их вазомоторную роль в артериях брыжейки и междолевых артериях почки крыс.

Методы. Эксперименты проводили на половозрелых самцах крыс Wistar. Содержание мРНК и белка порообразующей субъединицы TASK-1 канала в артериях легких, брыжейки и междолевых артериях почки оценивали методами ПЦР в реальном времени и Вестерн блоттинг, соответственно. Регистрацию сократительных ответов изолированных сегментов артерий проводили в изометрическом режиме с использованием миографа. Антиконстрикторную роль TASK-1 каналов оценивали с помощью блокатора TASK-1 каналов AVE1231. В некоторых экспериментах удаляли эндотелий с помощью крысиного уса.

Результаты. Содержание как белка, так и мРНК порообразующей субъединицы TASK-1 канала было наиболее высоким в легочных артериях, самым низким – в артериях брыжейки и занимало промежуточное значение в артериях почки. Блокада TASK-1 каналов с помощью AVE1231 (1 мкМ) привела к усилению сократительных ответов легочных артерий на агонист рецепторов тромбоксана A2 U46619, но не повлияла на базальный тонус и сократительные ответы артерий брыжейки и почки на агонист α 1-адренорецепторов метоксамин в условиях нормального физиологического pH 7.4. При повышении внеклеточного pH до 7.8 (путем увеличения содержания в растворе NaHCO₃ до 52 mM) AVE1231 вызвал развитие тонуса и усиление сократительных ответов на низкие концентрации метоксамин в артериях почки, но не брыжейки. Данный эффект не зависел от наличия интактного эндотелия.

Заключение. TASK-1 каналы обладают антиконстрикторным влиянием в междолевых артериях почки крыс условиях внеклеточного алкалоза в связи с относительно высоким уровнем экспрессии в данном сосудистом регионе.

Работа проводилась при поддержке Российского Научного Фонда (грант N20-75-00027). Мы благодарим Sanofi за предоставленный AVE1231.



ВЛИЯНИЕ НЕОНАТАЛЬНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА, ЗАДАВАЕМОГО
ВВЕДЕНИЯМИ ИЛ-1В ИЛИ ЛПС, НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ ВИСТАР: СРАВНЕНИЕ
ДВУХ МОДЕЛЕЙ, ОЦЕНКА ОСТРЫХ И ОТДАЛЕННЫХ ЭФФЕКТОВ

Широков Е.А.^{1,2}, Никитина В.А.¹, Коваленко А.А.^{1,3}, Шварц А.П.^{1,3}, Трофимов А.Н.¹

¹ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; ²ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия; ³ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

egor.a.shirokov@gmail.com

Воспалительный стресс в ходе раннего постнатального развития повышает риск возникновения нарушений развития центральной нервной системы (ЦНС), формирующих предрасположенность к когнитивной дисфункции. Ключевыми молекулярными факторами, опосредующими нарушение развития ЦНС, являются провоспалительные цитокины, в частности интерлейкин (ИЛ)-1 β , а один из механизмов такого воздействия – изменение экспрессии генов нейропластичности. В настоящей работе изучена реакция генов факторов роста: BDNF и FGF-2; а также отношение уровней экспрессии генов протеолитической системы мозга: MMP-9 и TIMP-1. Широко используемой моделью для изучения подобных нарушений является введение грызунам бактериального липополисахарида (ЛПС).

Целью работы явилось изучение острого и отложенного эффектов неонатального воспалительного стресса, задаваемого введением ЛПС либо ИЛ-1 β в умеренно-пирогенных дозах в течение 3-й недели жизни, на уровне экспрессии ряда генов нейропластичности в медиальной префронтальной коре (мПФК) и дорзальном гиппокампе (ДГ) в модельном эксперименте.

Работа проведена на крысах-самцах породы Вистар, разделённых на три группы: 1) ИЛ-1 β (1 мкг/кг/день ИЛ-1 β i.p., P15–21), 2) ЛПС (25 мкг/кг/день ЛПС i.p., P15,18,21), 3) контроль (физ.р-р i.p., P15–21). Образцы тканей мПФК и ДГ забирали через 2 ч после последней инъекции для изучения острых эффектов, и в половозрелом возрасте (2,5 мес) для изучения отложенных эффектов. Оценку уровня экспрессии исследуемых генов проводили по относительному количеству мРНК методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Статистическая обработка результатов: дисперсионный анализ и апостериорное попарное сравнение, $p < 0,05$.

В мПФК введение провоспалительных факторов не влияет на экспрессию гена *Bdnf* и отношение уровней экспрессии *Mmp9/Timp1*. При этом наблюдается дифференциальное влияние ИЛ-1 β и ЛПС на уровень экспрессии гена *Fgf2*: через 2 ч после инъекции он повышается при введении ИЛ-1 β , но не ЛПС; в отдаленной перспективе введение ЛПС приводит к его снижению. Для ДГ наблюдаются следующие отдалённые эффекты: экспрессия гена *Bdnf* и отношение уровней экспрессии *Mmp9/Timp1* снижаются относительно контрольных значений при введении как ИЛ-1 β , так и ЛПС; введение ЛПС, но не ИЛ-1 β приводит к снижению уровня экспрессии гена *Fgf2*.

Таким образом, введение ИЛ-1 β и ЛПС в течение 3-й недели жизни оказывает дифференциальное острое и отдалённое воздействие на экспрессию генов нейропластичности в мозге.



УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ДЕПО ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В ПЕРИСИНАПТИЧЕСКИХ ОТРОСТКАХ АСТРОЦИТОВ

Шишкова Е.А., Рогачевский В.В.

Институт биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

shishkova@neuro.nnov.ru

vadim_rogachevsky@synapsis.ru

Кальциевая динамика – один из ключевых механизмов сигнализации в астроцитарной сети. Ca^{2+} -активность проявляется в непосредственной близости к аксошипиковым синапсам, в узлах ветвления перисинаптических отростков астроцитов (PAPs). В основе такой активности могут лежать Ca^{2+} -связывающие белки гладкого эндоплазматического ретикулума (sER). Однако традиционно считается, что PAPs лишены каких-либо органелл. Но визуализации цистерн sER в PAPs может препятствовать использованию общепринятых методов пробоподготовки.

Мы исследовали эффекты применения альтернативных методов пост-фиксации ткани и контрастирования ультратонких срезов на ультраструктуру sER в PAPs и отростках нейронов в мозге крыс и мышей. Тогда как двойное осмирование зрелого мозга мышей позволило визуализировать цистерны sER в PAPs, модификация протокола контрастирования – обработка срезов забуференным какодилатом экстрактом чая улун с последующим контрастированием по Sato – значительно облегчала визуализацию sER в нейронах и глиальных клетках ювелирного мозга крыс. Используемый метод контрастирования позволял в дендритах нейронов выявлять цистерны sER диаметром сечения в считанные нанометры.

Двойное осмирование ткани зрелого мозга с последующим контрастированием вышеописанным способом или только по Sato позволило разделить sER в PAPs на 3 предположительно функционально различных компартмента: 1) цистерны с широким просветом (~ 60 нм), сходным с просветом у шероховатого ER; 2) слабоконтрастные цистерны диаметром 30-150 нм, у которых просматривается липидный бислой, но лишь после цифрового усиления контраста изображения; и 3) тонкие «нитевидные» цистерны с диаметром сечения порядка 20-30 нм с электронно-плотным окружением и содержимым, сходные по плотности и контрасту с цистернами sER немиелинизированных аксонов и шипикового аппарата дендритных шипиков, как известно отвечающего за Ca^{2+} -регуляцию в отростках нейронов. Интересно то, что мы проводили анализ с конечным разрешением порядка 0,7 нм/пикс. ($\times 15K$), тогда как поперечные сечения sER последнего типа на меньшем разрешении ($\times 6K \approx 1,8$ нм/пикс.) были неотличимы от гранул гликогена.

Безусловно, визуализация sER в PAPs открывает новые горизонты для морфофункциональных исследований участия глии в работе мозга, но поскольку однозначно определить принадлежность наблюдаемой структуры к sER возможно только на серийных срезах с высоким разрешением, такие исследования требуют применения приборов, обеспечивающих высокоразрешающую автоматизированную съемку.



УСИЛЕНИЕ ВОЗБУЖДАЮЩЕГО ВХОДА НА УРОВНЕ ОДНОЙ КЛЕТКИ ВО ВРЕМЯ ВЫЗВАННОЙ ФОКАЛЬНОЙ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В СОМАТОСЕНСОРНОЙ КОРЕ ВЗРОСЛОЙ КРЫСЫ

Шумкова В.В.¹, Ситдикова В.Р.¹, Минлебаев М.Г.^{1,2}

¹ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия;

²Средиземноморский институт нейробиологии (INMED), Марсель, Франция

victshumkova@gmail.com

Эпилепсия – хроническое заболевание нервной системы, сопровождающееся периодическими приступами гиперсинхронной нейрональной активности. Считается, что одним из ее основных механизмов является доминирование возбуждения над торможением в нейронной сети. Однако, остается неизвестным, это смещение связано с увеличением возбуждающих или же с уменьшением тормозных входов. Чтобы ответить на данный вопрос, мы оценивали глутаматные токи (основные возбуждающие токи в ЦНС) в контроле и во время вызванной эпилептической активности.

Эксперименты проводились на взрослеющих крысах р18-27, где р0-день рождения. Использовался метод локальной фиксации потенциала (patch clamp) *in vivo*. Клетки регистрировались на мембранном потенциале покоя (-60 мВ) в контроле и во время вызванной эпилептической активности. Эпилептиформная активность вызывалась с помощью инъекций 4-аминопиридина (4-АП, 100 мМ, 0,5-1 мкл).

Наши результаты показали, что эпилептиформная активность сопровождается усилением возбуждения в нейронной сети. Сравнение глутаматных токов показало увеличение частоты во время эпилептической активности. В то время как в контроле средняя частота глутаматных токов составляет 1.1 ± 0.12 /сек (16 клеток, 10 животных). Во время 4-АП вызванной эпилептиформной активности частота глутаматных токов увеличивалась до 4.32 ± 0.47 /сек (4 клетки, 1 животных). Анализ синхронности показал, что во время эпилептической активности наблюдается прирост коэффициента модуляции в диапазоне ± 50 мс от тока. (контроль 0.52 ± 0.03 , эпилептиформная активность 0.67 ± 0.04). Это свидетельствует, что во время эпилептической активности токи становятся более синхронными.

Несмотря на то, что для ответа на поставленный нами вопрос необходимо проведение дальнейших исследований, полученные нами предварительные данные говорят как об увеличении возбуждающего вклада, так и его синхронизации *in vivo*. Можно предположить, что эпилептическая активность приводила к сдвигу баланса в сторону возбуждения, что подтверждается с ранее продемонстрированными данными с использованием *in vitro* подходов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-25-00225.



ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ N-BENZAMIDE ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МЫШЕЙ В ТЕСТЕ ОТКРЫТОЕ ПОЛЕ

Ющенко И.П., Жданов А.В., Хацко С.Л.

ФГАОУ ВО УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург, Россия

hardscore@mail.ru

Из многих классов химических веществ в течение последних десятилетий возрастает интерес к производным N-methylbenzamide. Отечественными и зарубежными учеными уделяется много внимания по ведению синтеза и поиску их полезного биологического и медицинского действия. Производные cyclohexyl-N-methylbenzamide обладают анксиолитической, анальгетической и другими активными свойствами.

Цель исследования – изучение влияния (dimethylamino)cyclohexyl-N-benzamide и (diethylamino)cyclohexyl-N-benzamide под сокращенным названием У-47 и У-49 соответственно, на поведенческую активность мышей.

Методы. Эксперимент был проведен на 56 белых беспородных мышей-самок массой 30 г., возрастом 6 месяцев (N=8 на группу). Животные содержались в соответствии с основными положениями Директивы 2010/63/EU от 22 сентября 2010 года. Установка «Открытое поле» серого цвета с отверстиями, сборки OpenScience. Время тестирования – 5 минут. Оценивается горизонтальная и вертикальная двигательная активность (ГДА и ВДА), исследовательское поведение, груминговое поведение, а также вегетативный баланс. Тестирование начинали через 15-минут после внутрибрюшинного введения препаратов. Исследовали У-47(0,5, 2,5 и 5 мг/кг), У-49(5, 10 и 25 мг/кг) и контроль (физ. раствор). Анализ данных проводили с помощью программы Statistica 12.0. Сравнение опытной и контрольных групп проводили с использованием критерия Краскела – Уоллиса ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. У-47 в дозе 0,5 мг/кг снижает ГДА и увеличивал продолжительность и частоту замирания. В дозе 2,5 значительно увеличивает ГДА и снижал ВДА по сравнению с контрольной группой. В дозе 5 мг/кг препарат вызывал выраженные реакции, подобные катаlepsии и хвоста Штрауба, ингибировал исследовательскую и двигательную активность и вызывал явную дезориентацию, атаксию и аномальное дыхание. У-49 при остром введении в дозах 5, 10 и 25 мг/кг у мышей не вызывает изменения сознания, характерного для психоактивных веществ. Течение острой поведенческой реакции на стресс у подопытных животных опытной группы находится в пределах нормы контрольных животных, однако при повышении дозировки наблюдаются подергивания конечностей.

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что У-47 является сильнодействующим психоактивным препаратом, стимулирующим локомоторную активность при 2,5 мг/кг и с седативными свойствами при 0,5 мг/кг, в дозе 5 мг/кг оказывает сильный угнетающий и токсический эффект на ЦНС. У-49 не проявляет психоактивных свойств в исследуемых дозах.



ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ФОТОБИОЛОГИЯ

ТУШЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА ПРИ ОБЛУЧЕНИИ КАРОТИНОИДОВ СИНЕ-ЗЕЛЕНЫМ СВЕТОМ У ПУРПУРНЫХ СЕРНЫХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Ашихмин А.А.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

AshikhminAA@gmail.com

Фотосинтез – это ключевой процесс превращения энергии солнечного света в химическую энергию, который обеспечивает существование жизни на Земле. Фотосинтезирующие бактерии имеют наиболее просто организованный фотосинтетический аппарат. Его светособирающая антенна обычно состоит из двух типов пигмент-белковых комплексов (LH1 и LH2), а также реакционных центров. Бактериохлорофилл (БХл) и каротиноиды являются основными светособирающими пигментами.

Цель данной работы заключалась в исследовании процесса тушения флуоресценции БХл при облучении в область поглощения каротиноидов в мембранах и пигмент-белковых комплексах LH2 пурпурных серных фотосинтезирующих бактерий. В качестве объектов исследования использовали две пурпурные серные бактерии *Allochromatium (Alc.) minutissimum* и *Ectothiorhodospira (Ect.) haloalkaliphila* с различным содержанием каротиноидов (от 20 до 100%). Для снижения содержания каротиноидов культуры клеток выращивали в присутствии дифениламина – ингибитора каротиноидгенеза. Было показано, что сине-зеленый свет (область 440 – 550 нм), поглощаемый каротиноидами, приводил к тушению флуоресценции БХл в мембранах и пигмент-белковых комплексах LH2. Этот процесс был частично обратим в темноте. Обнаружено, что в контрольных мембранах интенсивность тушения флуоресценции БХл у *Ect. haloalkaliphila* была больше в 1,5 раза, чем у *Alc. minutissimum*, а в комплексах LH2 в 9-10 раз ниже. Обнаружена прямая зависимость между уменьшением эффективности тушения флуоресценции БХл и снижением количественного содержания каротиноидов. В образцах со сниженным содержанием каротиноидов наибольшее тушение флуоресценции БХл отмечено при освещении в область 465-490 нм, что, согласно данным ВЭЖХ анализа, прямо пропорционально содержанию ОН-нейроспорина и нейроспорина. Установлено, что эффективность передачи энергии возбуждения от каротиноидов на БХл зависит от количества сопряженных двойных связей в молекуле каротиноида и его микроокружения. Несмотря на широко распространенное мнение, что каротиноиды в фотосинтетическом аппарате бактерий проявляют защитные свойства, мы предполагаем, что они не способны эффективно защитить БХл от сильного сине-зеленого света, который они сами поглощают.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук №МК-1352.2021.1.4.



ДОСИМПТОМНОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ X В НЕИНКУЛИРОВАННЫХ УЧАСТКАХ ЛИСТЬЕВ *NICOTIANA BENTHAMIANA* МЕТОДОМ РАМ-ФЛУОРИМЕТРИИ

**Гришина А.И., Гринберг М.А., Хлопков А.Д., Агеева М.Н., Здобнова Т.А.,
Брилкина А.А., Воденеев В.А.**

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

79159532707@yandex.ru

Несмотря на то, что в настоящее время в сельском хозяйстве используют в основном сорта растений, обладающие достаточно высокой устойчивостью к поражению патогенами, ежегодно во всем мире наблюдаются потери урожая на 10–20% из-за болезней растений, что представляет серьезную угрозу глобальной продовольственной безопасности. Раннее выявление заболевания очень важно, так как это позволяет снизить потери урожая за счет своевременной локализации очага заражения и повысить качество продукции за счет меньшего применения пестицидов и фунгицидов. В связи с этим особую актуальность приобретает развитие методов досимптомного выявления заболеваний растений, среди которых оптические методы представляются наиболее перспективными в силу высокой информативности и скорости анализа в сочетании с невысокой его стоимостью.

Целью данной работы явился поиск показателей РАМ-флуориметрии, являющихся надежными индикаторами инфицированных областей в растениях.

Исследования проводились на четырёхнедельных растениях *Nicotiana benthamiana*, инфицированных вирусом картофеля PVX, имеющего сшитый с белком оболочки флуоресцентный белок GFP. Инфицирование растений проводили с помощью агробактериальной инфильтрации четвёртого листа. Регистрировали индуцированную светом динамику таких показателей как квантовый выход фотосистемы II (YII) и нефотохимическое тушение флуоресценции (NPQ). Локализацию вируса в целом растении контролировали путем регистрации флуоресценции GFP.

В адаптированном к свету состоянии в зараженной области неинкулированного листа наблюдалось небольшое отличие стационарных значений YII и NPQ по сравнению с таковыми в здоровой области того же листа. В отличие от стационарных показателей, динамика YII и NPQ, обусловленная включением актиничного света в здоровых и зараженных участках листа, существенно различалась. Коэффициенты корреляции между параметрами флуоресценции хлорофилла и локализацией вируса составили 0,67 для YII и 0,76 для NPQ.

Полученные результаты показывают, что для уверенного определения зараженных площадей листа по параметрам флуоресценции хлорофилла, оцениваемыми с помощью метода РАМ, необходимо соблюдение методики измерения. В частности, четкое разграничение на здоровые и зараженные участки на основе показателя YII в диапазоне 40–60 с после включения актиничного света и в диапазоне 20–40 с на основе NPQ.

Поддержано НЦМУ «Центр Фотоники», при финансировании Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2020-927.



ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ В ИССЛЕДОВАНИИ РАБОТЫ ХИНОЛ-ОКИСЛЯЮЩЕГО САЙТА ЦИТОХРОМНОГО b_6f КОМПЛЕКСА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Вильянен Д.В.¹, Павлов И.Б.^{1,2}, Борисова-Мубаракшина М.М.¹, Козулева М.А.¹

¹ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушчино, Россия;

²ФГОУ ВПО Биотехнологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

vilyadar@gmail.com

Ингибиторный анализ – подход, широко применяемый в исследованиях функционирования фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ФЭТЦ), в том числе цитохромного b_6f комплекса, наиболее часто используемыми ингибиторами которого являются соединения, предотвращающие окисление пластохинола в хинол-окисляющем сайте цитохромного b_6f комплекса: дибромтимохинон (DBMIB) и 2,4-динитрофениловый эфир 2-йодо-4-нитротимола (DNP-INT).

В недавно опубликованном исследовании, проведенном с использованием изолированных тилакоидов шпината, мы показали, что сродство DNP-INT к хинол-окисляющему сайту зависит от интенсивности света и поглощения протонов тилакоидами. При высокой интенсивности света DNP-INT работает как эффективный ингибитор электронного транспорта; при низкой интенсивности света его ингибирующая активность снижается. При этом сродство DNP-INT к хинол-окисляющему сайту даже при низкой интенсивности света увеличивалось с повышением степени протонирования аминокислотных (АК) остатков мембранных белков. Однако активность другого ингибитора, DBMIB, зависит от интенсивности света, но не от протонирования АК остатков мембранных белков. Таким образом, сравнение действия DBMIB и DNP-INT на ФЭТЦ представляет собой уникальный исследовательский инструмент, позволяющий отделить влияние рН люмена и протонирования АК остатков мембранных белков от других факторов, влияющих на работу цитохромного b_6f комплекса.

При окислении пластохинола специальные АК остатки хинол-окисляющего сайта осуществляют его депротонирование, после чего протоны переходят в люмен. Эффективность оттока протонов от этих АК остатков регулирует скорость окисления пластохинола, и мы решили исследовать, каким именно образом осуществляется этот отток. Известно, что в регуляции кислотно-щелочного равновесия участвуют карбоангидразы (КА) – ферменты, катализирующие обратимую гидратацию молекул CO_2 . С помощью ингибиторного анализа мы обнаружили, что в присутствии бикарбонат-ионов, являющихся субстратом КА, ингибирующая активность DNP-INT зависит от активности карбоангидразы, принадлежащей к α -семейству, α -КА 2: в тилакоидах, выделенных из растений арабидопсиса дикого типа, активность DNP-INT снижалась в присутствии ингибитора КА, этоксизоламида, однако в тилакоидах, выделенных из нокаут-мутантов по α -КА 2, этого не происходило. При этом действие DBMIB, ингибирующая активность которого не зависит от протонирования АК остатков хинол-окисляющего сайта, остается неизменным вне зависимости от активности КА. На основе полученных данных мы предполагаем, что фермент α -КА 2 может участвовать в оттоке протонов от хинол-окисляющего сайта цитохромного b_6f комплекса, тем самым играя важную роль в развитии фотосинтетического контроля.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-24-01074.



ВЛИЯНИЕ СВЕТА И ВЕЛИЧИНЫ pH ЛЮМЕНА НА РАБОТУ ЦИТОХРОМНОГО b6f КОМПЛЕКСА В ТИЛАКОИДАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Павлов И.Б.^{1,2}, Вильянен Д.В.¹, Козулева М.А.¹

¹ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия;

²ФГОУ ВПО Биотехнологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

ilusha1403@gmail.com

Цитохромный b6f комплекс – центральное звено в фотосинтетической электрон-транспортной цепи, которое осуществляет цикл редокс-реакций с пластохиноном/-олом (Q-цикл) и вносит вклад в создание трансмембранного протонного градиента. Именно окисление пластохинола в хинол-окисляющем сайте b6f-комплекса является лимитирующим этапом для всего процесса электронного транспорта. Главным фактором, определяющим скорость протекания этой реакции, является величина pH люмена тилакоидов, а явление замедления скорости транспорта электронов, вызванное понижением люминального pH, называется “фотосинтетическим контролем”. В предыдущей работе мы предположили, что в условиях фотосинтетического контроля, наступающих, в частности, при повышенной освещенности, сродство пластохинола к хинол-окисляющему сайту уменьшается, по-видимому, за счёт изменения архитектуры сайта в условиях закисленного люмена, вызванного протонированием ключевых аминокислот сайта. Однако не исключено, что сами условия повышенной освещенности могут каким-то иным образом влиять на работу цитохромного b6f комплекса.

Объектом исследования являлись интактные тилакоидные мембраны, выделенные из шпината и арабидопсиса экотипа Columbia. Работу полной цепи в суспензии тилакоидов смотрели путем измерения на кислородном электроде поглощения кислорода. Основным экспериментальным подходом было варьирование концентрации конкурентных ингибиторов окисления пластохинола в хинол-окисляющем сайте, дибромтимохинона (DBMIB) и 2,4-динитрофенилового эфира 2-йодо- 4-нитротимола (DNP-INT). Было проанализировано влияние интенсивности освещения и величины люминального pH, которая варьировалась путём добавки каналобразователя грамицидина Д (GrD), на характер зависимости обратной скорости электронного транспорта от концентрации ингибитора. Нами было обнаружено, что зависимость для DNP-INT и DBMIB носит линейный характер в условиях высокой освещённости в присутствии GrD, предписывая этим ингибиторам конкурентный тип ингибирования с полным торможением. Однако при низкой освещённости в присутствии GrD, уравнивающей величину pH люмена с величиной pH среды реакции (7.6), зависимости для обоих ингибиторов отклоняются от линейности, что указывает на частичное торможение окисления пластохинола в сайте. Исключение из среды реакции GrD в условиях низкой интенсивности света приводило к появлению линейного характера зависимости для DNP-INT, но не влияло на характер зависимости в случае DBMIB. Этот результат показывает, что величина pH люмена влияет на сродство хинол-окисляющего сайта к DNP-INT, но не влияет на сродство сайта к DBMIB.

Таким образом, мы показали, что переход от ингибирования с частичным торможением реакции к ингибированию с полным торможением реакции, наблюдаемый при переходе от условий низкой освещенности к условиям высокой освещенности как в случае DNP-INT, так и для DBMIB, связан не с протонированием ключевых аминокислот в сайте, а обусловлен протеканием других процессов, происходящих в цитохромном b6f комплексе. Данные результаты являются первым свидетельством того, что работа цитохромного b6f комплекса непосредственно зависит от условий освещения.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-01074.



ВЛИЯНИЕ СВЕТА ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ И УФ-В НА АКТИВНОСТЬ ФА ПРИ ДЕФИЦИТЕ ФОТОРЕЦЕПТОРОВ

Строкина В.В., Худякова А.Ю., Креславский В.Д.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушкино, Россия

strokina.93@mail.ru

Свет жизненно важен для роста и развития растений. При этом свет действует через набор различных фоторецепторов, среди которых ключевую роль играют фитохромы, криптохромы и фототропины. Они регулирует многие процессы метаболизма и фотоморфогенеза растений. Однако роль фитохромов и криптохромов в регуляции процессов фотосинтеза менее изучена, прежде всего это относится к стрессоустойчивости фотосинтетического аппарата (ФА) и адаптации к факторам внешней среды, в частности, к УФ-радиации и свету высокой интенсивности (СВИ).

В представленной работе были изучены возможные пути влияния фоторецепторов – фитохромов и криптохромов, на ФА томата и арабидопсиса при воздействии СВИ и УФ-В.

На примере мутантов *Solanum lycopersicum* с дефицитом ключевых фоторецепторов этих растений (ФхА, ФхВ1, ФхВ2 и криптохром 1) и *A. thaliana* дикого типа (ДТ) с дефицитом ФхА и ФхВ или криптохромов 1 или 2 было изучено влияние СВИ (1000 мкмоль квантов м² с⁻¹) и УФ-В (7 мкмоль квантов м⁻² с⁻¹) на фотохимическую активность ФС2 и фотосинтез, а также на содержание пигментов (каротиноиды и флавоноиды) и низкомолекулярных антиоксидантов и активность антиоксидантных ферментов при дефиците этих фоторецепторов.

Обнаружено, что у растений арабидопсиса, выращенных с дефицитом ФхВ, по сравнению с растениями дефицитными по ФхА или криптохрому 1, по сравнению с растениями с дефицитом криптохрома 2 было более существенно снижено содержание различных пигментов (каротиноиды, фенольные соединения), а также понижена активность ряда антиоксидантных ферментов. После облучения СВИ или УФ-В эта тенденция сохранялась. Дефицит ФхВ, и в меньшей степени ФхА, был также критичен для устойчивости ФА к СВИ и УФ-В. При этом скорость фотосинтеза и максимальный квантовый выход ФС2 томатов к действию кратковременного СВИ возрастает в следующем ряду: Кр1хВ1ФхА > ФхАФхВ1ФхВ2 > ФхВ1ФхВ2 = ФхВ1А = ФхВ2А > Кр1 > ФхВ1 = ФхВ2 = ФхА. При этом и содержание фотосинтетических пигментов, и активность ключевых ферментов были исходно ниже и оставались сниженными после облучения растений СВИ именно у тройных мутантов.

Сделано заключение, что низкая устойчивость ФА мутантов томатов и арабидопсиса к СВИ и УФ-В в значительной степени связана с пониженным содержанием в листьях низкомолекулярных антиоксидантов (антоцианы, каротиноиды и флавоноиды), и сниженной активностью ключевых антиоксидантных ферментов (гваякол-зависимая пероксидаза, глутатионредуктаза)

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 20-04-00512А.



ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ И ЗАСОЛЕНИЯ НА ЦИТОЗОЛЬНЫЙ pH РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ С ГЕНЕТИЧЕСКИ-КОДИРУЕМЫМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ СЕНСОРОМ Pt-GFP

**Печёркина А.А., Агеева М.Н., Гринберг М.А., Здобнова Т.А.,
Брилкина А.А., Воденев В.А.**

ФГАОУ ВО Национальный исследовательский Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

pechyorinaa@gmail.com

Цитозольный pH влияет на функционирование многих клеточных систем и ферментов, что обуславливает выделение протонной сигнальной системы наравне с системами Ca^{2+} и АФК в сигналинге растения. Уровень pH тесно связан с функционированием H^+ -АТФазы плазмалеммы, которая так же способна влиять на характер электрических потенциалов растения. *In vivo* исследование уровня pH как на клеточном уровне, так и на уровне целых органов растения может быть осуществлено с помощью ратиометрического pH-сенсора Pt-GFP. Целью данной работы является исследование изменения pH в листьях модельных растений картофеля при термических воздействиях и засолении.

Флуоресцентный имиджинг изменения pH в листьях картофеля проводили с помощью установки поверхностного оптического имиджинга DVS-03 (ИФТ РАН, Россия) и использовали для возбуждения сенсора светодиодами 395/25 нм и 490/20 нм. Флуоресцентные изображения создавали с помощью CMOS-камеры в диапазоне 535/43 нм с экспозицией 2 с. Зависимость флуоресценции сенсора Pt-GFP от pH определяли посредством инкубирования листьев в буферных растворах с pH от 4 до 9 и с КЦХФГ с последующим получением изображений при возбуждении диодами и построением графика зависимости F490/F395 от pH.

Термическую обработку производили в трёх вариантах: ступенчатое охлаждение или нагревание с помощью элемента Пельтье всего листа до 3°C или до 59,1°C соответственно или нагревание кончика листа до 52,7°C. Одновременно с флуоресцентным имиджингом фиксировали электрические сигналы листа с помощью макроэлектродов, подключенных к pH-метру/иономеру Мультитест ИПЛ-113 (НПП «Семико», Россия). Влияние засоления на pH определяли с помощью добавления в почву 200 мМ NaCl и измерения флуоресценции сенсора в течение трёх дней. Тестирование работы H^+ -АТФазы проводили на листьях, обработанных 2,5 мМ Na_3VO_4 .

Во время охлаждения листовой поверхности происходило закисление цитозоля, однако при пересечении зоны температурного оптимума наблюдалось повышение pH. При действии высоких температур характер изменения pH был противоположным. Генерация переменного потенциала наблюдалась при действии высоких температур. Также была доказана важная роль H^+ -АТФазы плазмалеммы в изменении цитозольного pH и электрических потенциалов. Модельные растения картофеля с pH-чувствительным белком Pt-GFP могут быть использованы для исследования пространственного и временного изменения уровня pH при действии различных стрессирующих факторов.

Поддержано НЦМУ «Центр Фотоники», при финансировании Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2020-927.



ОЦЕНКА ПРОРАСТАНИЯ И ПЛОЩАДИ ЛИСТОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ ПОТОМКОВ
A. THALIANA ЧЕРНОБЫЛЬСКОГО ЭКОТИПА ПОСЛЕ ОСТРОГО
ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ СЕМЯН

Блинова Я.А., Бабина Д.Д., Подобед М.Ю., Казакова Е.А., Волкова П.Ю.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»,
Обнинск, Россия

yana.manuhina@yandex.ru

Одним из последствий аварии на Чернобыльской АЭС является крупномасштабное загрязнение территорий долгоживущими радионуклидами. Растения произрастают в течение многих поколений на этих территориях в условиях хронического радиационного воздействия.

Известно, что подвергшиеся воздействию стрессоров растения могут характеризоваться большей устойчивостью к дополнительному влиянию стрессовых факторов. Таким образом, облучение семян, собранных с загрязненных территорий, представляет возможность оценить уровень их радиоадаптации.

Семена модельного растения *A. thaliana* были отобраны в нескольких бывших населенных пунктах, расположенных в зоне отчуждения ЧАЭС в ПГРЭЗ (Республика Беларусь). Участки Масаны и Выгребная Слобода характеризовались повышенным уровнем радиационного фона, участок Бабчин фоновым уровнем радиоактивного загрязнения.

Оценку влияния острого гамма-облучения на прорастание и площадь поверхности листьев потомков *A. thaliana* провели с использованием семян первого поколения, собранных в 2019 году, и второго поколения, полученного в лаборатории из семян 2021 года. Семена помещали на стратификацию на 7 суток, затем облучали на γ -установке ГУР-120 (^{60}Co) в дозе 150 Гр (мощность дозы 463 Гр/ч). Контрольные и облученные семена проращивали на среде $\frac{1}{2}$ МС в камере фитотрона. Всхожесть семян оценивали в течение первых семи суток по разрыву эндосперма и появлению корешка. Площадь поверхности листьев проростков оценивали на 10-е сутки с помощью программы Easy Leaf Area. Для статистического анализа использовали MS Office Excel 2019, STATISTICA 8.0.

Облучение семян двух поколений существенно не повлияло на их прорастание.

Площадь листовой поверхности как первого, так и второго поколений на участке Бабчин статистически значимо уменьшалась после обработки семян острым γ -облучением. Статистически значимое снижение площади листовой поверхности отмечено у второго поколения на участке Масаны после воздействия стрессора. Обработка γ -облучением семян двух поколений с участка Выгребная Слобода не вызвало значимых изменений исследуемого параметра.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 20-74-10004.



ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ У РЖИ

Буланов А.Н., Решетникова Г.Д., Зыкин П.А., Андреева Е.А., Цветкова Н.В.

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

an.bulanov20002014@gmail.com

Рожь *Secale cereale L.* – важное сельскохозяйственное растение. Однако, геном растения, в отличие от геномов других злаковых растений, довольно плохо изучен. За долгую историю своего окультуривания рожь сохранила крайне широкое естественное разнообразие признаков. Одним из таких признаков является способность к биосинтезу широкого спектра флавоноидных веществ – важных вторичных метаболитов растений – и, в частности, антоцианов, выполняющих в том числе функцию пигментации органов. Биосинтез флавоноидов катализируется четырнадцатью основными ферментами, обуславливающими последовательные превращения фенилаланина, и десятками других белков, модифицирующих молекулы этих веществ дополнительными заместителями (например, сахарами). Эти белки кодируются т. н. структурными генами биосинтеза, но очень важное значение в проявлении признака имеют и регуляторные гены, кодирующие транскрипционные факторы (ТФ), регулирующие синтез ферментов.

На данный момент доступно две версии полного генома ржи, что позволяет поставить задачу проведения биоинформатического поиска генов биосинтеза флавоноидов по гомологии с другими злаками. Нами обнаружено порядка восьмисот предполагаемых генов, большая часть из которых являются структурными и представлены в нескольких копиях, число которых может достигать пятидесяти. Для выявления функциональных копий генов проводится сравнительный анализ с транскриптомными данными, полученными нашей группой для 4 линий, и данными из базы сырых прочтений SRA NCBI для разных линий и органов растения.

Особенный интерес для нас представляет одна из мутаций, обуславливающая антоциановую пигментацию генеративных и вегетативных органов растения, *Vs*, тесно сцепленная с двумя мутациями безантоциановости *vi4* и *vi5*, и маркером, соответствующим гену транскрипционного фактора MYC типа. Во многих работах показано, что именно MYC белки в комплексе с двумя другими типами ТФ играют ключевую роль в регуляции экспрессии структурных генов биосинтеза флавоноидов. Мы предполагаем аллельность мутаций *vi4*, *vi5* и *Vs* и то, что они локализованы в гене MYC транскрипционного фактора – гомолога локуса *R-S (Red seed)* описанного у кукурузы. Нами ведётся работа по секвенированию кодирующих последовательностей гена *R-S* у пяти линий ржи с разными аллельными состояниями исследуемого локуса, что позволит проверить гипотезу локализации изучаемых мутаций в гене-гомологе *R-S*.



ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И МОДЕЛИРУЕМОЙ ЗАСУХИ НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ *ARABIDOPSIS THALIANA* ДИКОГО ТИПА И МУТАНТНОЙ ЛИНИИ *hpsa1*

**Подобед М.Ю., Бабина Д.Д., Бондаренко Е.В., Блинова Я.А., Казакова Е.А.,
Пишенин И.А., Горбатова И.В., Волкова П.Ю.**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»,
Обнинск, Россия

podobedmyu@gmail.com

Активные формы кислорода (АФК) связаны с реакцией растений на различные стрессовые стимулы. Пероксид водорода (H_2O_2) – одна из форм АФК, которая синтезируется в апопласте в ответ на внешние стрессоры и внутренние сигналы. В растительных клетках H_2O_2 регулирует поток ионов Ca^{2+} , которые являются одними из наиболее важных вторичных посредников, связывающих внеклеточные сигналы со специфическими внутриклеточными реакциями. В этой работе исследовалось, как восприятие внеклеточного H_2O_2 интегрируется с процессами прорастания и развития растений на фоне засухи и теплового стресса.

А работе использовали растения *A. thaliana* дикого типа Col-0, Col-8 и линии *hpsa1* (мутантная по чувствительности к H_2O_2 (локус *AT5G49760*)). В процессе исследования оценивали динамику прорастания, площадь поверхности листьев (программа Easy Leaf Area) и параметры фотосинтеза (флуориметр Junior-PAM, Walz). При моделировании гипертермического воздействия семена нагревали в термостате при температуре 50 °С. Время нагрева составляло 0, 2, 4 и 6 часов. В качестве агента для создания дефицита воды на среде использовали полиэтиленгликоль (ПЭГ) (молярный вес 5000-7000 г/моль).

С увеличением концентрации ПЭГ в среде среднее время прорастания статистически значимо увеличивалось у линий Col-0 и *hpsa1* по сравнению с контролем. Коэффициент синхронизации прорастания (при содержании ПЭГ 9, 13, 17 и 20%) для линии *hpsa1* был значимо выше контрольных показателей этой же линии, что указывает на низкую синхронность прорастания семян.

Гипертермическая обработка семян в течение 2 часов статистически значимо стимулировала прорастание семян дикого типа Col-0, и в течение 4 часов – прорастание семян *hpsa1*. Площадь поверхности листьев, после гипертермической обработки семян, значимо увеличивалась в сравнении с контрольными растениями у линии Col-0 при самом длительном нагреве (6 ч), в то время как у мутантной линии *hpsa1* аналогичный эффект наблюдали при меньшем нагреве (2 ч). Таким образом, большая площадь поверхности листьев у исследуемых растений не связана с их более ранним прорастанием.

При анализе фотосинтетических параметров воздействие ПЭГ оказало более выраженный эффект на дикий тип (Col-8), чем на мутантную линию *hpsa1*, что может быть связано с тем, что у мутантной линии нарушено H_2O_2 -индуцированное закрытие устьиц, так как ген *HPSA1* является ключевым компонентом передачи сигналов H_2O_2 для контроля замыкающих клеток устьиц, регуляция работы которых происходит за счет изменений в фотосинтезе и транспирации.



ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ХВОЕ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PINUS SYLVESTRIS* L.), НА РАДИОАКТИВНО ЗАГРЯЗНЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ БРЯНСКОЙ ОБЛАСТИ

Празян А.А., Шестерикова Е.М., Гераськин С.А., Бабина Д.Д.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт радиологии и агроэкологии»,
Обнинск, Россия

prazyana@yahoo.com

Авария на Чернобыльской АЭС повлекла за собой последствия, губительные для обширных территорий. Это привело к изменению работы ферментативной, антиоксидантной и других систем растений. Исследования на популяциях сосны обыкновенной, произрастающих на загрязненных территориях, позволят выяснить механизмы адаптации популяций к существующим уровням радиационного воздействия.

Повышенная генерация активных форм кислорода (АФК) является одной из реакций на стрессовое воздействие. Для контроля уровня АФК и защиты клеток от их повреждающего воздействия и продуктов перекисного окисления липидов, возникающих в результате действия стрессора на растения, существует система, которая обезвреживает АФК с помощью ферментативных и неферментативных антиоксидантов (Прадедова и др., 2011).

Таким образом, целью нашей работы явилась оценка активности ферментов в хвое сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), обитающей на радиоактивно загрязненных территориях, методом спектрофотометрического анализа.

В данной работе произведена оценка активности антиоксидантных ферментов каталазы (САТ), аскорбатпероксидазы (АРХ), гваяколовой пероксидазы (РОХ) в образцах хвои с трех участков Брянской области, загрязнённых в результате аварии Чернобыльской АЭС, и двух контрольных участков.

Активность фермента каталазы определяли по динамике разложения пероксида водорода ферментом. Анализ выполнен по методике, описанной в (Биссвангер, 2013) с модификациями.

Метод оценки активности аскорбатпероксидазы основан на определении скорости разложения перекиси водорода аскорбатпероксидазой исследуемого образца с образованием воды и дегидроаскорбата.

Оценка активности гваяколовой пероксидазы основана на её способности в присутствии пероксида водорода катализировать превращение гваякола в тетрагваякол.

Из результатов экспериментов стало известно, что статистически значимые отличия от контрольных групп в активности ферментов присутствуют только у аскорбатпероксидазы. В то же время ферменты каталазы и гваяколовой пероксидазы не показали достаточного уровня активности, чтобы считаться значимыми, в сравнении с контрольными группами.

Литература.

Прадедова, Е.В. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений / Е.В. Прадедова, О.Д. Ишеева, Р.К. Салаяев // Физиология растений. – 2011. – Т. 58. – № 2. – С. 177-185.

Биссвангер, Х. Практическая энзимология / Х. Биссвангер. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2013. – 328 с.



СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОГО РАЗВИТИЯ В РАСТЕНИЯХ РОДА *BOECHERA* (*BRASSICACEAE*)

Чепель В.И.

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

chepelvika04101998@gmail.com

В природе более 400 видов растений размножаются посредством репродуктивного феномена, называемого апомиксисом. Фактически, апомиксис приводит к потомству, которое является генетической копией материнского растения. Род *Boechera* представляет собой интересную модель для понимания апомиксиса, в котором встречаются как половые, так и апомиктические генотипы на диплоидном уровне. Апомиксис содержит три компонента развития: образование нередуцированной яйцеклетки – апомейоз, независимый от оплодотворения эмбриогенез – партеногенез и развитие эндосперма – автономно или псевдогамно (с оплодотворением).

Внедрение апомиксиса в сельскохозяйственные культуры считается предвестником зеленой революции за счет сохранения полезных гибридных признаков в следующих поколениях. Однако разработка апомиктической технологии в сельском хозяйстве требует более глубокого знания механизмов контроля апомиксиса и его отклонений от полового процесса.

Для изучения развития *B. stricta*, *B. divaricarpa* (линии ES517, M4B) мы провели ряд сравнительных исследований, включающих цитоэмбриологический анализ развития женского гаметофита и исследование гена *APOLLO*, ассоциированного с апомейозом в данном роде.

При цитоэмбриологическом исследовании семязачатков дифференциально-интерференционным методом контрастирования (DIC) было подтверждено половое развитие в растении *B. stricta*, в то время в *B. divaricarpa* (линия ES517, M4B) было установлено апомиктическое развитие. Было определено, что основными индикаторами апомиксиса являются остановка мегаспорогенеза на стадии диад мегаспор вместо тетрад, как при половом развитии.

В ходе исследования плоидности растений методом проточной цитометрии, было обнаружено, что *B. divaricarpa* и *B. stricta* являются диплоидными растениями. Полученные результаты послужили основой для исследования экспрессии гена *APOLLO* в данных видах, вследствие возможности сравнивать различия в экспрессии генов между апомиктическими и половыми особями без смешивающих эффектов полиплоидии. Ген *APOLLO* является гетерозиготным по специфичным для апомиксиса аллелям у апомиктов. Методом ПЦР мы обнаружили наличие секс-аллелей и апо-аллелей в *B. divaricarpa*, в то время как в *B. stricta* апо-аллели отсутствуют.

В дополнение к вышесказанному мы исследовали плоидность семян *B. divaricarpa* (линия ES517) и установили, что развитие соответствует диплоспоровому апомиксису с псевдогамным развитием эндосперма ($2n:6n$).

Исследования выполнены при поддержке гранта РФФИ № 120-54-46002.



ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ МИНЕРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ НА МОРФОГЕНЕЗ СОРТОВ *VITIS* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Хусаинова А.Р., Сергеев Р.В., Окулова Е.А., Тимаков А.А., Шургин В.А.

ФГБОУ ВО «Поволжский государственный технологический университет»,
Йошкар-Ола, Россия

HusainovaAR@volgatech.net

В настоящее время на территории России активно развивается виноградарство, так как виноград используется во многих отраслях пищевой промышленности. Однако для эффективного развития отрасли виноградарства необходим качественный посадочный материал для закладки плантаций. Одним из главных способов получения свободного от инфекций посадочного материала является размножение в культуре *in vitro*.

Размножение винограда с помощью культуры ткани получило коммерческо-направленное распространение во всем мире. Однако различные сорта реагируют неодинаково на конкретный состав среды. Степень реакции в значительной степени зависит от конкретного генотипа, питательной среды и использования регуляторов роста растений. Известно, что значительное влияние на морфогенез винограда в культуре *in vitro* оказывает концентрация минеральных солей в составе питательной среды. Следовательно, необходимо разработать оптимальный состав питательной среды для размножения коммерчески значимых сортов винограда, произрастающих в России.

Материалом для исследования служили растения винограда *Vitis vinifera* L. сортов Самбо, Ксения, Руслан, Аркадия и Юбилей херсонского Дачника (ЮХД). Были применены традиционные методы размножения растений *in vitro*. Для введения в культуру пазушных почек использовали твердые агаризованные питательные среды Мурасиге и Скуга (Murashige and Skoog, 1962) с полной, 3/4, 1/2, 1/4 концентрациями минеральных солей с добавлением регуляторов роста растений 0,05 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИМК.

В результате эксперимента установлено, что наибольшие значения исследуемых параметров морфогенеза было отмечено у сортов Аркадия, Ксения и Руслан, начиная с четвертой недели измерений при использовании варианта питательной среды 1/2МС, для сорта Самбо – вариант среды полная МС. Для вышеуказанных сортов было отмечено образование каллуса на среде 1/4МС на третьей неделе культивирования. Для сорта ЮХД ни на одном варианте среды не произошло инициации побегов и корней.

Таким образом, для сортов Аркадия, Ксения и Руслан было выявлено положительное влияние уменьшения концентрации минеральных солей в среде МС, что может быть применено в получении посадочного материала с использованием размножения в культуре *in vitro*.

Исследование было поддержано Минобрнауки Российской Федерации (Грант № 075-15-2021-674) и ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВО «ПГТУ».

Литература.

Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures/T. Murashige, F. Skoog // *Physiol Plant.* – 1962. – V. 15(3). – P. 473-497.



ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБОНГИДРАЗЫ ГРАНАЛЬНЫХ ТИЛАКОИДОВ
ARABIDOPSIS THALIANA

Маркин Р.В., Федорчук Т.П.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

romanmarkin998@gmail.com

Карбоангидраза (КА) – фермент, катализирующий обратимое взаимопревращение CO_2 и HCO_3^- . Он обнаружен во всех живых организмах, от прокариот до человека, что указывает на значимость данного фермента для живой материи. В геноме *Arabidopsis thaliana* имеется 19 генов, кодирующих КА, но локализация и функции многих из них до сих пор неясны или подвергаются сомнению. В тилакоидах выделяют три источника КА активности, связанных с мембраной, один из которых, α -КА5, находится в области стромальных тилакоидов. В свою очередь, в области гранальных тилакоидов, вблизи фотосистемы 2 (ФС2), обнаружено 2 источника карбоангидразой активности, различающиеся по молекулярной массе, которые до сих пор не идентифицированы. До сих пор нет четкого ответа на вопрос о природе высокомолекулярной КА: является ли она отдельным ферментом или превращение бикарбоната в углекислый газ идет за счет скоординированного определенным образом в тилакоидной мембране белкового комплекса. Существует ряд предположений, что выявляемая КА активность, принадлежит α -КА2. Целью работы было выделение и характеристика высокомолекулярного источника КА активности гранальных тилакоидов.

В работе использовали растения *Arabidopsis thaliana* в которых отсутствует КА стромальных тилакоидов, α -КА5. При помощи ступенчатого центрифугирования и использования детергентов был получен препарат, в котором отсутствовали фрагменты мембран стромальных тилакоидов. Исходя из отношения хлорофилла *a/b*, кривых низкотемпературной флуоресценции хлорофилла, а также вестерн-блоттинга с антителами против корового белка ФС1, PsaA, корового белка ФС2, PsbA, и шести белков светособирающего комплекса ФС2, Lhcb1-6, установлено, что препарат содержал коровую область ФС2 и все белки светособирающего комплекса. В геле после проведения нативного электрофореза выявили одну белковую полосу в высокомолекулярной области, которая обладала карбоангидразной активностью. Но в денатурирующих условиях проведения электрофореза обнаруженная КА активность исчезала. С помощью аффинной хроматографии установили, что выявленная карбоангидразная активность принадлежит отдельному белку, а не белковому комплексу.



ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АДАПТАЦИЯ ФОТОСИСТЕМЫ 2
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII К СНИЖЕНИЮ УРОВНЯ CO₂ В СРЕДЕ
ВЫРАЩИВАНИЯ ПРИ ОТСУТСТВИИ КАРБОАНГИДРАЗЫ САНЗ
В ЛЮМЕНЕ ТИЛАКОИДОВ

Четверкина А.А., Шукшина А.К., Терентьев В.В.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушино, Россия

lstthp@gmail.com

Зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* является классическим объектом исследований фотосинтеза. В нашей работе мы использовали клетки дикого типа (ДТ) и мутанта *cia3*, с отсутствующей карбоангидразой (КА) САНЗ в люмене тилакоидов. КА являются широко распространенными в природе ферментами, катализирующими обратимую реакцию гидратации CO₂. В *C. reinhardtii* на сегодняшний день насчитывается 13 КАз, локализуемых в разных компартментах клетки. САНЗ является единственной КА, ассоциация которой с пигмент-белковым комплексом фотосистемы 2 (ФС2) показана экспериментально.

Целью работы было изучить функциональную адаптацию ФС2 из *C. reinhardtii* к снижению уровня CO₂ в среде выращивания при отсутствии карбоангидразы САНЗ в люмене тилакоидов. Для этого измерялись O₂-выделяющая активность клеток ДТ и мутанта, а также максимальный (Fv/Fm) и эффективный (Y(II)) квантовые выходы, рассчитанные на основе переменной флуоресценции хлорофилла (Хл), в широком диапазоне интенсивностей действующего света 25–3900 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹.

Было выявлено, что для клеток ДТ и *cia3*, выращенных при 5% CO₂, характерны схожие световые кривые O₂-выделяющей активности с достижением плато при ~2900 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, где скорость выделения O₂ достигала 220–230 мкмоль O₂ (мг Хл ч)⁻¹. При этом световые кривые для клеток, адаптированных к низкому CO₂ достигали плато при ~2000 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, а максимальная скорость выделения O₂ составляла 190–200 и 140–150 мкмоль O₂ (мг Хл ч)⁻¹, соответственно.

Значение Fv/Fm составляло ~0,7 во всех изучаемых условиях выращивания. При этом величина Y(II) для клеток, выращенных при 5% CO₂, достигала 0,5 и 0,35 (т.е. 50% от Fv/Fm) при повышении действующего света, соответственно, до ~340 и ~550 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ как в случае ДТ, так и *cia3*. В культурах водорослей, адаптированных к низкому CO₂, величина Y(II) в ДТ достигала значений 0,5 и 0,35 при повышении действующего света уже до ~190 и ~340 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, соответственно, а в случае *cia3* даже при ~110 и ~150 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, соответственно.

Полученные результаты свидетельствовали о схожей фотосинтетической активности ФС2 в клетках ДТ и *cia3* при выращивании культур в оптимальных условиях при повышенном CO₂. Однако в условиях низкого CO₂ функциональная устойчивость ФС2 в мутанте *cia3* значительно снижалась по сравнению с ДТ несмотря на то, что потенциально возможная эффективность ФС2, отражаемая максимальным квантовым выходом, оставалась одинаковой.



ВЛИЯНИЕ КАРБОАНГИДРАЗЫ САНЗ НА СТРУКТУРУ И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ
АКТИВНОСТЬ ВОДООКИСЛЯЮЩЕГО КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ 2 ИЗ
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Шукшина А.К., Терентьев В.В.

ФГБУН Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук –
обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пушчино, Россия

ferrretka@mail.ru

Для карбоангидразы (КА) САНЗ из *C. reinhardtii* показана ее ассоциация с донорной стороной фотосистемы 2 (ФС2), где ее КА-активность, вероятно, может оказывать влияние на функционирование водоокисляющего комплекса (ВОК).

Целью данной работы было изучение влияния белка САНЗ на фотосинтетическую активность ФС2, а также организацию нативной структуры ВОК. В качестве объектов исследования использовали мембранные частицы, обогащенные ФС2, изолированные из дикого типа (ДТ) и мутанта *cia3*, лишенного САНЗ в люмене тилакоидов.

Изучали фотосинтетическую активность ФС2 из *C. reinhardtii*, ее зависимость от pH, а также ионной силы среды. Кроме того, исследовали белковый состав препаратов ФС2 из ДТ и *cia3* с помощью электрофореза в денатурирующих условиях и вестерн-блот-анализа.

При pH 6,5, оптимальном для активности ВОК, скорость выделения O₂ не отличалась у ДТ и *cia3* (~280 мкмоль O₂ (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹). При повышении pH наблюдалось на ~20% более сильное подавление O₂-выделяющей активности в случае ФС2 из *cia3* по сравнению с ФС2 из ДТ. Активность снижалась до уровня *cia3* в присутствии ингибиторов КА, свидетельствующая о роли КА-активности САНЗ в наблюдаемом различии. Повышение активности до уровня ДТ при 500 мкМ HCO₃⁻ указывало на дегидратазное направление катализируемой САНЗ реакции.

При повышении ионной силы O₂-выделяющая активность в ФС2 из ДТ слабо изменялась в диапазоне NaCl 5–100 мМ, при этом в *cia3* подавлялась на 10% и 30% при 50 и 100 мМ, соответственно. Дополнительная инкубация с NaCl увеличивало эту разницу. Ингибирование КА-активности САНЗ не оказывало влияния. Данные указывали на структурную роль САНЗ в ВОК и более масштабные конформационные изменения белков ВОК, подавляющие его функцию, при повышении ионной силы раствора в отсутствие белка САНЗ (*cia3*).

Несмотря на схожее содержание белков корового комплекса (D1) и ВОК ФС2 (PsbO, PsbP) в препаратах из ДТ и *cia3* на одинаковое содержание Хл, САНЗ детектировалась блотом только в препаратах ФС2 из ДТ. Отмывание белков ВОК повышением NaCl показало более затрудненное удаление PsbP из ФС2 из *cia3*. Его содержание составляло ~75% и ~10% при, соответственно, 100 и 500 мМ NaCl в ФС2 из ДТ, при этом, 100% и ~30% при, соответственно, 100 и 500 мМ NaCl в ФС2 из *cia3*. Можно предположить формирование дополнительных гидрофобных и/или электростатических взаимосвязей между белками ВОК как результат отсутствия белка САНЗ.

Таким образом, отсутствие белка САНЗ оказывает влияние на структурно-функциональное состояние ВОК в ФС2 из *C. reinhardtii*.



АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

А

| | |
|-----------------------|----------------------|
| Абаленихина Ю.В. | 164 |
| Абашеев Р.Ю. | 240 |
| Абашина Т.Н. | 34 |
| Абдульманова Д.И. | 204 |
| Абрамова О.В. | 97, 287 |
| Аверина О.А. | 112, 314 |
| Авторыева Е.Л. | 167 |
| Агаджанян А.А. | 8, 277 |
| Агеева М.Н. | 353, 357 |
| Агол В.И. | 13 |
| Адаменков Н.А. | 284 |
| Аджубей А.А. | 91 |
| Ажикина Т.Л. | 118 |
| Азарнова Т.О. | 171 |
| Азарова Д.Ю. | 165 |
| Азимов К.А. | 214 |
| Акатов В.С. | 181 |
| Акберова Н.И. | 62, 71, 80, 84 |
| Акентьев Ф.И. | 259 |
| Акосах Йав Абайе | 4 |
| Аксёнов-Грибанов Д.В. | 17, 36, 53, 199, 233 |
| Алеев В.С. | 5 |
| Алейникова О.В. | 288 |
| Алекперова Л. | 289 |
| Александрова М.А. | 345 |
| Александровская Н.А. | 317 |
| Алексеев А.А. | 56 |
| Алексеева С.Э. | 270 |
| Алехин В.А. | 96 |
| Алиева И.Б. | 239 |
| Алилова Г.А. | 166 |
| Алкалаева Е.З. | 114, 162 |
| Алферов С.В. | 206 |
| Аль Фаррух М. | 6 |
| Ананьев А.С. | 290 |
| Анашкина А.А. | 91 |
| Андреев М.А. | 291 |
| Андреева Е.А. | 359 |
| Андрианова Н.В. | 86, 301 |
| Андриянова А.А. | 135 |
| Андрющенко Н.В. | 97 |

| | |
|-------------------|---------------|
| Аникина В.А. | 226, 262 |
| Анохин К.В. | 321, 325 |
| Анохина Г.Б. | 167 |
| Антипова Т.В. | 34 |
| Антоненко Ю.Н. | 247 |
| Антонова Д.А. | 7, 33 |
| Антонова О.Ю. | 261, 275, 282 |
| Ануфриева Н.В. | 178 |
| Апашкин П.С. | 100 |
| Арбатский М.С. | 300 |
| Артемова В.Д. | 98 |
| Артёмова В.С. | 292, 316 |
| Артыкбаева Г.М. | 168 |
| Аругян А.А. | 8 |
| Архипова С.С. | 222 |
| Асякина А.С. | 293 |
| Атауллаханов Р.И. | 63 |
| Ахалкаци А.Т. | 21 |
| Ашихмин А.А. | 352 |

Б

| | |
|------------------|-------------------|
| Бабенко В.А. | 279 |
| Бабина Д.Д. | 85, 358, 360, 361 |
| Бабурина Ю.Л. | 74, 333 |
| Бабынин Э.В. | 4 |
| Баженова Е.А. | 6 |
| Базовкина Д.В. | 326 |
| Балакина А.А. | 174 |
| Балалаева И.В. | 58, 75, 88, 89 |
| Балезина О.П. | 341 |
| Балобанов В.А. | 96 |
| Балханов Ю.С. | 240 |
| Банникова А.Е. | 294 |
| Баранов М.С. | 57 |
| Барановский Д.С. | 280 |
| Барбитов Ю.А. | 25 |
| Бардак М.В. | 8 |
| Барыкин Е.П. | 91 |
| Басалова Н.А. | 300, 317 |
| Басович Л.С. | 295 |
| Басовский Ю.И. | 231 |
| Бахтюков А.А. | 215, 238, 244 |



| | | | |
|---------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| Башкирова И.Г. | 9, 52 | Брусков В.И. | 226 |
| Безгина М.Д. | 251 | Брутер А.В. | 229 |
| Беликова Л.Д. | 239 | Брюхин В.Б. | 69 |
| Белова Н. А. | 90 | Брянская Е.О. | 299 |
| Белослудцев К.Н. | 247 | Бугмырин С.В. | 195 |
| Белоусов А.С. | 57, 252 | Бугрова А.Е. | 165 |
| Бельшенко А.Ю. | 17, 36, 53 | Бугрова Ю.С. | 58 |
| Бельдия Е.А. | 296, 309 | Будагова Т.Ю. | 8 |
| Беляев Г.П. | 216 | Будаев Э.Ц. | 240 |
| Бережнов А.В. | 134, 315 | Букатин А.С. | 273 |
| Березина О.В. | 260, 265 | Букина Ю.О. | 61, 217 |
| Беспятова Л.А. | 195 | Булавина М.К. | 50 |
| Бессонова В.А. | 99 | Буланов А.Н. | 359 |
| Бизяев Н.С. | 114, 162 | Буренина О.Ю. | 157 |
| Бирицкая С.А. | 191 | Буркатовский Д.С. | 59 |
| Бирулина Ю.Г. | 343 | Бутузова Д.А. | 300 |
| Блинова Я.А. | 85, 358, 360 | Бухаева Л.Б. | 191 |
| Блохин В.Е. | 294, 297, 337 | Буян М.И. | 301 |
| Блохин И.Г. | 100, 101 | Быстрова М.Ф. | 94 |
| Бобков Г.А. | 102 | Бычков Е.Р. | 237 |
| Боброва Е.В. | 322 | | |
| Богачихин Д.А. | 206 | В | |
| Богданов А.В. | 182 | Валеева Е.В. | 302 |
| Богданов В.В. | 294, 297 | Валеева Л.Р. | 113, 151 |
| Богданов И.И. | 45 | Валуев И.Л. | 297 |
| Богданов М.В. | 62 | Валуев Л.И. | 297 |
| Богданова А.М. | 185 | Вальков И.Н. | 187 |
| Богомаз Д.И. | 119 | Вальков Л.Н. | 187 |
| Богородский А.О. | 59, 83 | Вандышев Г.К. | 59 |
| Богоцкой К.А. | 298 | Варакса Т.С. | 70 |
| Божокин М.С. | 267 | Василенко Л.М. | 60, 79 |
| Болбат Н.Б. | 276 | Васильева А.Д. | 165 |
| Болдинова Е.О. | 108, 131 | Васильева Т.В. | 127, 154 |
| Болихова А.К. | 103, 112 | Вахрамеев Д.Д. | 78 |
| Бондарев С.А. | 110, 114, 121, 132, 251 | Ведяйкин А.Д. | 12, 40 |
| Бондарева И.Р. | 169 | Верещагина К.П. | 190 |
| Бондарева Л.Л. | 176 | Вершинина Е.А. | 322 |
| Бондаренко В.С. | 104 | Весновский В.В. | 188 |
| Бондаренко Е.В. | 104, 360 | Ветрова А.А. | 30 |
| Бондаренко С.В. | 104 | Ветрова О.С. | 61, 217 |
| Борзых А.А. | 346 | Ветровой О.В. | 303, 334 |
| Борисова-Мубаракшина М.М. | 354 | Вильянен Д.В. | 354, 355 |
| Боровлева П.И. | 186 | Винник Д.А. | 218, 245 |
| Бородкина А.В. | 142 | Виноградов В.А. | 240 |
| Борщевский В.И. | 57, 70, 78, 83 | Виноградова А.И. | 219 |
| Бочарников А.Д. | 338 | Виноградова Е.С. | 133 |
| Бочаров Э.В. | 106 | Виноградова С.В. | 47 |
| Бочкова Е.А. | 14 | Винокуров А.Ю. | 186, 299, 305, 323, 339 |
| Боярская Н.В. | 307 | Виривская Е.В. | 323 |
| Брилкина А.А. | 89, 353, 357 | | |



| | | | |
|--------------------|------------------|------------------|---------------|
| Вишняков И.Е. | 12, 40 | Голубец Д.И. | 191 |
| Владимиров И.А. | 119 | Голубкина Н.А. | 173 |
| Владимирова А.В. | 220 | Голубова Н.В. | 274 |
| Владимирова С.А. | 105, 122 | Гончаров И. | 65 |
| Власенкова Р.А. | 62 | Горбатова И.В. | 360 |
| Воденеев В.А. | 89, 353, 357 | Горбач Н.М. | 207 |
| Волков М.В. | 255 | Горина С.Ю. | 170 |
| Волкова П.Ю. | 85, 358, 360 | Горохова А.А. | 58 |
| Волченко Н.Н. | 8 | Горшков А.Ю. | 313 |
| Воробьев И.И. | 263 | Горшкова Е.Н. | 146, 159 |
| Воробьев И.И. | 221 | Горшкова М.Ю. | 297 |
| Воронина М.Д. | 63 | Горюнов И.А. | 284 |
| Воронова Е.А. | 224 | Горюнов К.В. | 279 |
| Вторушина В.В. | 279 | Грановский И.Э. | 19 |
| Выштакалюк А.Б. | 216 | Грачев Д.И. | 66 |
| | | Григоров А.С. | 118 |
| Г | | Гринберг М.А. | 353, 357 |
| Габова А.О. | 10 | Гринева А.С. | 335 |
| Габриелян Л.С. | 8, 277 | Гринченко А.В. | 252 |
| Гавриленкова А.А. | 106 | Гришина А.И. | 353 |
| Гаврилина Е.С. | 165 | Гробушкин П.А. | 13 |
| Гайдин С.Г. | 64 | Громова А.С. | 108 |
| Гайдина А.С. | 170, 179 | Громова Е.С. | 130 |
| Гайдуков А.Е. | 341 | Губайдуллин И.И. | 259 |
| Гайнетдинов Р.Р. | 136 | Гужова И.В. | 105, 122, 310 |
| Гайнуллина Д.К. | 346, 347 | Гулая В.С. | 109 |
| Гайнуллина Д.К. | 346 | Гумарова Л.Ф. | 216 |
| Галяметдинова И.В. | 216 | Гунтупова К.В. | 240 |
| Ганина С.О. | 236 | Гурков А.Н. | 190, 268, 276 |
| Ганке Д.Д. | 336 | Гурьев Н.А. | 138 |
| Ганнесен А.В. | 11 | Гусач А.Ю. | 78 |
| Ганцова Е.А. | 106 | Гусев О. | 177 |
| Гапеев А.Б. | 61, 217 | Гуцин И. | 65, 83 |
| Гарбуз М.М. | 107 | Гуцин И.Ю. | 83 |
| Гарджук А.А. | 304 | | |
| Гафуров О.Ш. | 290 | Д | |
| Гаямова Е.А. | 221 | Давыдова Г.А. | 218, 245 |
| Генатуллина А.И. | 130 | Данилов Л.Г. | 110, 283 |
| Герасимов А.С. | 78 | Дармаев Э.О. | 240 |
| Гераскина О.В. | 11 | Дашевский Д.Е. | 67 |
| Гераськин С.А. | 104, 361 | Даянова Л.К. | 221 |
| Гилеп А.А. | 70 | Деев И.Е. | 106 |
| Гильмуллина К.А. | 296 | Деев Р.А. | 253 |
| Гладнева Е.Е. | 13 | Делеган Я.А. | 30 |
| Глазко В.И. | 68, 93, 120, 160 | Демидкина Т.В. | 178 |
| Глушкова О.В. | 230 | Денисова Д.А. | 111 |
| Гнучих Е.Ю. | 278 | Денисова Е.Р. | 112 |
| Голофеева Д.М. | 12, 40 | Дергилева А.Д. | 223 |
| Голубенко М.А. | 222 | Деркач К.В. | 215, 238, 244 |



| | | | |
|-------------------|---------------|------------------|--------------------|
| Ивашкина О.И. | 321, 325 | Ким А.Р. | 294, 297 |
| Иващенко С.Д. | 140 | Ким Д.В. | 108 |
| Ивин Ю.Ю. | 13 | Кирилин Е.М. | 72 |
| Игнатъев К.С. | 306 | Киселев М.О. | 119 |
| Иззи А.Р. | 116 | Киселева И.В. | 6, 20, 31 |
| Ильина Н.Б. | 96 | Киссер М.-С.М. | 120 |
| Ильина Ю.А. | 156 | Клабуков И.Д. | 280 |
| Ильчибаева Т.В. | 326 | Клаузен П.Е. | 128 |
| Имидоева Н.А. | 17 | Клычников О.И. | 300 |
| Иминова Л.Р. | 258 | Князева В.М. | 344 |
| Инвиева Е.В. | 279 | Кобякова М.И. | 223 |
| Индейкина М.И. | 165 | Ковалев В.В. | 252 |
| Исагулиева А.К. | 117 | Ковалёв Е.А. | 24 |
| Исаева Л.В. | 256 | Ковалев К.В. | 83 |
| Исакова К.В. | 192 | Коваленко А.А. | 348 |
| Истомина М.С. | 310 | Ковалицкая Ю.Е. | 261 |
| Ишанходжаев Т.М. | 168 | Коваль В.С. | 178 |
| | | Ковнир С.В. | 221 |
| К | | Кодрян М.А. | 280 |
| Кабанова Н.Б. | 261 | Козлов А.Е. | 231 |
| Казакова Е.А. | 358, 360 | Козлов Д.Г. | 259 |
| Казакова Р.Р. | 182 | Козлова А.А. | 327 |
| Кайрат Б.К. | 64 | Козлова А.В. | 121, 149 |
| Калабанова Д.Д. | 259 | Козлова А.С. | 62, 71, 80, 84 |
| Калашников М.В. | 260, 265 | Козлова Т.Н. | 193 |
| Калашникова Т.В. | 18 | Козмай Я.А. | 228 |
| Каленикова Е.И. | 243 | Козулева М.А. | 354, 355 |
| Калинин Д.С. | 19 | Кокорева Н.Е. | 122 |
| Калинина Н.О. | 13 | Колачева А.А. | 289, 294, 297, 337 |
| Калмантаева О.В. | 14 | Колганихина Г.Б. | 47 |
| Кальнин А.Ю. | 154 | Колесник Е.С. | 123 |
| Кандурова К.Ю. | 274 | Колесникова В.В. | 124 |
| Канев И.Л. | 261, 282 | Колмакова К.Ю. | 171 |
| Канов Е.В. | 136 | Колманович Д.Д. | 262 |
| Капранов И.А. | 70 | Коломыцева М.П. | 170, 179 |
| Каратовская А.П. | 50 | Колпашиков Д.М. | 102, 127, 154 |
| Карелкин В.В. | 143, 155, 295 | Кольцов А.Ю. | 28, 46 |
| Каримова Е.В. | 9 | Кольцова Г.С. | 28, 46 |
| Карманова Е.Е. | 226 | Комарова Е.Ю. | 105 |
| Карнаухов Д.Ю. | 191 | Комахин Р.А. | 115 |
| Карпов А.С. | 118 | Комисаренко А.А. | 194 |
| Карпова М.А. | 70 | Комиссаров А.Б. | 31 |
| Карпова Н.С. | 219, 227 | Комиссаров А.С. | 69, 76 |
| Карташевский И.И. | 293 | Кондратьева Е.С. | 190 |
| Катина Н.С. | 96 | Конев А.Ю. | 126, 156 |
| Катраева И.В. | 254 | Конева А.Л. | 249 |
| Качанова О.С. | 307 | Коннов С.И. | 72 |
| Каширская Н.Н. | 211, 212, 213 | Конова К.Ю. | 140 |
| Квиткина А.К. | 189 | Кононихин А.С. | 165 |
| | | Копылова Г.В. | 296, 309 |



| | | | |
|------------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|
| Копылова Е.Е. | 261 | Куринов А.М. | 345 |
| Коркина Т.В. | 191 | Курочкина Ю.А. | 231 |
| Коробов В.С. | 140 | Курышкина М.С. | 264 |
| Королев А.И. | 313 | Кустикова М.А. | 204 |
| Корсакова Е.С. | 22 | Кухарский М.С. | 324 |
| Коршунова Д.С. | 229 | Кучинская Я.А. | 126 |
| Косенко Е.А. | 166 | Кучур П.Д. | 76 |
| Косенков А.М. | 64 | Кущенко А.С. | 13 |
| Костенко В.В. | 198 | | |
| Костина Д.А. | 143, 147, 155, 295 | Л | |
| Котова А.В. | 128 | Лавникова А.В. | 191 |
| Котова П.Д. | 73, 308 | Лагарькова М.А. | 239 |
| Кочерова Н.А. | 195 | Лазарев В.Ф. | 310 |
| Кочеткова О.Ю. | 261, 275, 282 | Лазаренко В.С. | 347 |
| Кочетов А.П. | 253 | Ланских Д.В. | 252 |
| Кочина Я.А. | 263 | Ларионова А.П. | 23 |
| Кочиш И.И. | 257 | Ларичева И.И. | 21 |
| Кочкина Е.Н. | 73 | Ларченко А.Ю. | 24 |
| Кочурова А.М. | 296, 309 | Ларюшкин Д.П. | 64 |
| Кравцова О.А. | 302 | Латыпов О.Р. | 19 |
| Красота А.Ю. | 13 | Лаушкина В.О. | 127, 154 |
| Краюшкина А.М. | 305 | Лахова Т.Н. | 77 |
| Креславский В.Д. | 356 | Лашин С.А. | 77 |
| Крестинин Р.Р. | 74, 333 | Лебедев И.А. | 215, 238 |
| Крестинина О.В. | 74, 333 | Лебедева И.Ю. | 288 |
| Кречетова Л.В. | 279 | Лебедева Л.А. | 140 |
| Крещенко Н.Д. | 82 | Леконцева Н.В. | 96 |
| Кривчикова Д.М. | 211 | Леняшина М.О. | 25 |
| Круглов А.Г. | 134, 247 | Леонова Л.Е. | 250 |
| Кручинин А.А. | 125 | Леонтьевский А.А. | 23, 48 |
| Крылова Л.В. | 75 | Ливанова А.А. | 340 |
| Ксенафонтов А.Д. | 20, 31 | Лизоркина К.И. | 311 |
| Кубарева Е.А. | 118, 139, 150, 157, 183 | Лисов А.В. | 23, 48 |
| Кубекина М.В. | 229 | Лобов А.А. | 92, 128, 141, 143, 147, 155, 307 |
| Куварзин С.Р. | 136 | Логашкин А.Е. | 312 |
| Кудрявцева А.А. | 96 | Логунов С.Е. | 129 |
| Кузеева А.А. | 230 | Лойко А.Г. | 130 |
| Кузнецова А.В. | 345 | Локтионова Ю.И. | 313 |
| Кузнецова Е.А. | 323 | Ломерт Е.В. | 334 |
| Кузнецова Л.С. | 310 | Ломовская Я.В. | 223 |
| Кузнецова У.Д. | 21 | Ломовский А.И. | 223 |
| Кузьмина Н.С. | 75 | Лугинина А.П. | 67, 78 |
| Кузякова О.Ю. | 252 | Лукин А.М. | 281 |
| Кулакова М.А. | 145 | Лунин С.М. | 230 |
| Кулебякина М.А. | 300 | Лучкина П.Н. | 50 |
| Кулеш П.А. | 22 | Лысикова Е.А. | 335 |
| Куликова В.В. | 178 | Люблинская О.Г. | 138 |
| Куликова Е.А. | 326 | Любонец Е.Н. | 43 |
| Кулишенко А.А. | 336 | Ляпина Е.А. | 78 |
| Куляк О.Ю. | 243 | | |
| Кумейко В.В. | 107, 109, 252 | | |



М

| | | | |
|------------------|------------------------------------------|---------------------|--------------------|
| Магазенкова Д.Н. | 172 | Мельникова Л.С. | 135 |
| Магкаев А.Т. | 21 | Менщикова А.К. | 133 |
| Мадьярова Е.В. | 203, 268 | Мехова А.А. | 232, 235 |
| Мазур А.М. | 103 | Микенькина М.А. | 315, 323, 339 |
| Маймистов Д.Н. | 283 | Микулинская Г.В. | 175, 180 |
| Майоров С.А. | 64 | Миндубаев А.З. | 4 |
| Майоров С.Г. | 19 | Минкова С.И. | 28 |
| Майорова Е.В. | 26 | Минлебаев М.Г. | 266, 312, 332, 350 |
| Майорова К.А. | 260, 265 | Митькевич В.А. | 91 |
| Макаревич П.И. | 317 | Митяшова О.С. | 288 |
| Макаров А.А. | 91 | Михайлина А.О. | 96 |
| Макарова А.В. | 108, 125, 131, 269 | Михайличенко А.С. | 27, 29 |
| Макарова М.А. | 14 | Михайлова Е.Р. | 267 |
| Макиевская К.И. | 86 | Михайлова М.А. | 313 |
| Максютенко Е.М. | 25 | Михалицына М.А. | 114 |
| Малахова Е.А. | 282 | Михеева Э.Р. | 254 |
| Малашичева А.Б. | 92, 128, 141, 143, 147, 155, 295, 307 | Мишин А.В. | 60, 78, 79, 153 |
| Малыкин Г.В. | 252 | Мишин А.С. | 57 |
| Мамаджанов А. | 168 | Мишуков А.А. | 134 |
| Мамлеев А.Р. | 266 | Мндлян Е.Ю. | 134 |
| Мамошин А.В. | 274 | Молдован А.И. | 173 |
| Мандрик М.И. | 24, 42 | Молодина В.В. | 135 |
| Мансурова М.Н. | 182 | Молодцова Д.С. | 81, 89 |
| Манукян А.А. | 131 | Молчанова А.В. | 176, 180 |
| Мануцян Т.А. | 277 | Монахова М.В. | 139, 150, 183 |
| Маргулис Б.А. | 105, 122, 310 | Моргунова М.М. | 36, 199, 233 |
| Маретина М.А. | 246 | Морозова А.Ю. | 97, 287 |
| Маркеева Е.А. | 60, 79 | Морозова Е.А. | 178 |
| Маркин Р.В. | 364 | Мосенцов А.А. | 241 |
| Марковская Е.Ф. | 208 | Москаленко С.Е. | 25, 132 |
| Мартынов Д.Д. | 80 | Мотлохова Е.А. | 343 |
| Мартьянов С.В. | 11, 14 | Мочалова Н.В. | 82 |
| Маруяма А. | 139 | Мужехоев А.А. | 196 |
| Марчева М.М. | 180 | Муллаева С.А. | 30 |
| Марченко Д.М. | 267 | Мумятова В.А. | 174 |
| Марченков В.В. | 96 | Мун В.В. | 234 |
| Марьин Е.В. | 78 | Муртазина Р.З. | 136 |
| Марьясина С.С. | 103, 112, 116, 129, 314 | Муруева А.В. | 220 |
| Масаки И. | 139 | Мусаева А.А. | 175 |
| Маслов И.А. | 57 | Мусаева Т.Д. | 20, 31 |
| Маслов И.В. | 59 | Мустафакулов М. | 168 |
| Массон П. | 84, 182 | Мутин А.Д. | 152 |
| Мастиленко А.В. | 45 | Мухаметгалиева А.Р. | 84 |
| Матвеев А.Г. | 27, 29 | Муханова М.А. | 137 |
| Матив А.Б. | 132 | Мухин А.М. | 77 |
| Матюшенко А.М. | 296, 309 | Мыльников П.Ю. | 164 |
| Мелконян К.И. | 228, 293, 327 | Мысин И.Е. | 59 |
| | | Мямина В.Е. | 43 |
| | | Мясоедова Н.М. | 179 |



Н

| | |
|-------------------|---------------|
| Нагорных М.О. | 15 |
| Назаренко В. | 65, 83 |
| Назаренко В.В. | 83 |
| Назаров И.Р. | 292, 316 |
| Назарова А.А. | 268, 276 |
| Натаров И. | 65 |
| Науменко В.С. | 326 |
| Наумов Е.И. | 273 |
| Неволина Е.Д. | 14 |
| Недорезова Д.Д. | 102, 127 |
| Некрасов П.А. | 20 |
| Нечаева Ю.И. | 32 |
| Никитина В.А. | 348 |
| Никифорова А.Б. | 247 |
| Николаев Е.Н. | 165 |
| Никонов И.Н. | 257 |
| Никонов С.В. | 162 |
| Никонова Е.Ю. | 124, 133, 162 |
| Никотина А.Д. | 105, 122 |
| Нимирицкий П.П. | 317 |
| Ничипоренко А.С. | 7, 33 |
| Новикова А.А. | 269 |
| Новикова И.Н. | 255 |
| Новикова Л.А. | 256 |
| Новоселецкая Е.С. | 317 |
| Новоселова Е.Г. | 230 |
| Носков А.Е. | 34 |

О

| | |
|------------------|---------------|
| Обухова Д.А. | 318 |
| Овчарова М.А. | 11 |
| Овчинников Р.К. | 324 |
| Овчинникова А.А. | 107 |
| Одиноква И.В. | 74, 134, 333 |
| Октябрьский О.Н. | 10, 47 |
| Окулова Е.А. | 200, 270, 363 |
| Олейников А.В. | 312 |
| Орехов Ф.С. | 78 |
| Орлов Ю.А. | 232, 235 |
| Орлова Н.А. | 221, 263 |
| Осяева Е.Н. | 138 |
| Отвагин В.Ф. | 75 |
| Охрименко И.С. | 70 |
| Ощепков Д.Ю. | 77 |
| Оя П.С. | 167 |

П

| | |
|----------------------|-------------------|
| Павлов И.Б. | 354, 355 |
| Павлов К.А. | 97 |
| Павлова А.В. | 139, 345 |
| Павлова Е.Н. | 294, 297 |
| Павлова О.А. | 119 |
| Палалов А.А. | 319, 330 |
| Пантелеев Д.Д. | 140 |
| Паншин Д.Д. | 141 |
| Парфенов А.А. | 216 |
| Парфенова П.С. | 142 |
| Парфенюк С.Б. | 230 |
| Пасаженикова Я.К. | 35 |
| Патлай А.А. | 271 |
| Паширова Т.Н. | 182 |
| Певзнер И.Б. | 301 |
| Переляева Е.В. | 17, 36, 53, 233 |
| Переплетчикова Д.А. | 143, 147 |
| Перчиков Р.Н. | 197 |
| Першина Е.В. | 304 |
| Пескова Н.Н. | 58, 75 |
| Пестерева Н.С. | 292, 316 |
| Петриков К.В. | 30, 39 |
| Петрова А.Г. | 208 |
| Петровская А.В. | 91 |
| Петропавловская Е.А. | 328 |
| Петросян А.А. | 209 |
| Петрушанко И.Ю. | 91 |
| Петушкова Е.П. | 26 |
| Петюренко М.Ю. | 144 |
| Печёрина А.А. | 357 |
| Печкова М.Г. | 320 |
| Пивоварова Н.С. | 283 |
| Писарева И.Н. | 54 |
| Писарева М.М. | 20, 31 |
| Пичугин А.А. | 307 |
| Пишенин И.А. | 360 |
| Плакунов В.К. | 11, 14 |
| Пластинина О.В. | 272 |
| Плешаков П.С. | 273 |
| Плотников Е.Ю. | 86, 279, 301, 338 |
| Плотников П.А. | 176 |
| Плотникова Е.Г. | 5, 32 |
| Плюснин В.В. | 321 |
| Пляченко Д.Р. | 322 |
| Погонялова М.Ю. | 323 |
| Подлуцкий М.С. | 85 |
| Подобед М.Ю. | 85, 358, 360 |
| Поздняков Н.В. | 281 |



| | | | |
|--------------------------|-----------------|-------------------|-------------------------|
| Позднякова-Филатова И.Ю. | 15, 16, 41, 177 | Розенфельд М.А. | 165 |
| Полесскова Е.В. | 249 | Рокитская Т.И. | 247 |
| Полтораченко В.А. | 269 | Романов А.А. | 232 |
| Польшаков В.И. | 314 | Ромодин Л.А. | 87 |
| Пономарева Т.И. | 177 | Рубель А.А. | 121, 149 |
| Попков В.А. | 86, 301 | Рубцов М.А. | 256 |
| Попов А.Л. | 248, 262 | Румянцева Н.А. | 12, 40 |
| Попов Д.Ю. | 323 | Русинова Т.В. | 327 |
| Попов П. | 78 | Рууге Э.К. | 66 |
| Попова Н.Р. | 226 | Рыжих Ю.С. | 41 |
| Поспелов А.Д. | 88 | Рыков С.В. | 260, 265 |
| Постникова К.Н. | 92 | Рыццов Г.К. | 61, 217 |
| Потапова Е.В. | 274, 319 | Рябина М.В. | 121, 149 |
| Потапова С.С. | 145 | | |
| Праведникова А.Э. | 98 | С | |
| Празян А.А. | 361 | Саатов Т.С. | 168 |
| Приземин В.Н. | 274 | Савицкая В.Ю. | 150 |
| Приходько С.И. | 54 | Садовская Т.А. | 171 |
| Прокулевич В.А. | 272 | Сазонова О.И. | 30 |
| Прохоров Д.А. | 180 | Сайфутдинова А.Р. | 198 |
| Прохорова А.П. | 37 | Салафутдинов И.И. | 222 |
| Прудникова С.В. | 220 | Саликова Д.А. | 328 |
| Пручкина М.А. | 38 | Самков А.А. | 8 |
| Пуговкина Н.А. | 138 | Самусева П.Д. | 232, 235 |
| Пукаева Н.Е. | 324 | Сандригайло Д.В. | 42 |
| Пучкова Л.В. | 6 | Санкова А.В. | 186 |
| Пушин А.С. | 253 | Санникова А.В. | 151 |
| Пушница В.А. | 191 | Саранчина А.Е. | 152, 268 |
| Пыльнев В.В. | 52 | Сауткина Н.В. | 43, 272 |
| | | Сафронова Н.А. | 153 |
| Р | | Северюхина М.С. | 329 |
| Раззоронова Е.А. | 146, 159 | Сеидкулиева А.А. | 164, 236 |
| Райхман Е.В. | 275 | Сейо К. | 139 |
| Ревтович С.В. | 178 | Селезнёва А.Д. | 42 |
| Режепова А.А. | 39 | Селиванова Н.В. | 169 |
| Ремеева А. | 65, 83 | Селимзянова А.И. | 260, 265 |
| Ремеева А.А. | 83 | Семенов В.Э. | 216 |
| Ренфельд Ж.В. | 170, 179 | Семенов О. | 65 |
| Репинская Ж.А. | 126 | Семёнова М.В. | 264 |
| Репкин Е.А. | 147 | Сенча Л.М. | 88 |
| Решетникова В.В. | 322 | Сень В.Д. | 174 |
| Решетникова Г.Д. | 359 | Сергеев А.В. | 130 |
| Ржевский С.Г. | 144 | Сергеев Р.В. | 200, 270, 363 |
| Ржечицкий Я.А. | 152, 190, 276 | Сергиев П.В. | 103, 112, 116, 129, 314 |
| Рогачев В.В. | 148 | Серёгина Е.С. | 319, 330 |
| Рогачевская О.А. | 94, 95, 261 | Середин Т.М. | 180 |
| Рогачевский В.В. | 349 | Серикова Я.А. | 44 |
| Рогожникова О.С. | 325 | Серова О.В. | 106 |
| Рогоза Т.М. | 110 | Сизов С.В. | 331 |
| Родный А.Я. | 326 | Силаева В.М. | 332 |



| | | | |
|-----------------|---------------|--------------------|-------------------------|
| Силаева Ю.Ю. | 229 | Тарасова Е.О. | 341 |
| Силачев Д.Н. | 279, 301 | Тарасова О.С. | 298, 347 |
| Синегубова М.В. | 263 | Таргош П.Г. | 93 |
| Ситдикова В.Р. | 332, 350 | Татаринов Д.А. | 182 |
| Ситдикова К.К. | 237 | Тверской А.М. | 91 |
| Ситникова Д.С. | 180 | Телина Э.Н. | 290 |
| Слуковская М.В. | 208 | Тельнова Т.Ю. | 199 |
| Слюдова Е.А. | 180 | Теплых М.А. | 191 |
| Слядовский Д.А. | 177 | Теренин И.М. | 162 |
| Смирнов В.В. | 127, 154 | Теренина Н.Б. | 82 |
| Смирнова А.Н. | 280 | Терентьев А.А. | 174 |
| Смирнова Г.В. | 18, 47 | Терентьев В.В. | 365, 366 |
| Смирнова Д.В. | 155 | Тигунцева Н.П. | 233 |
| Смоленцева А. | 65 | Тимаков А.А. | 200, 363 |
| Снегин Э.А. | 201 | Тимотина М.И. | 277 |
| Снхчян Ц.А. | 276 | Тимофеев М.А. | 152, 190, 203, 268, 276 |
| Сныга В.Г. | 150 | Тимофеева М.М. | 20 |
| Согорин Е.А. | 177, 281 | Тимченко М.А. | 177 |
| Солдатова М.О. | 339 | Тихонова Л.А. | 166 |
| Соловьева М.Е. | 181 | Тишкова М.В. | 336 |
| Солодухина У.Н. | 121, 149 | Тищенко А.Ю. | 201 |
| Солоп Е.А. | 228 | Токтохоева Л.Н. | 240 |
| Сороко С.С. | 81, 89 | Толстова А.П. | 91 |
| Сорокоумов В.Н. | 215, 238, 244 | Толстыко Е.А. | 249 |
| Сотникова Л.Д. | 74, 333 | Торопова К.А. | 321, 325 |
| Сошникова Н.В. | 117 | Торощина А.В. | 156 |
| Старцев В.В. | 207 | Трактиров Д.С. | 292, 316 |
| Степанова Т.А. | 90 | Трефилов В.С. | 157 |
| Степочкина А.М. | 215, 238, 244 | Триандафилова Г.А. | 47 |
| Столяренко А.Д. | 269 | Трофимов А.Н. | 348 |
| Сторожук С.В. | 228 | Трошев Д.В. | 337 |
| Стратиллов В.А. | 334 | Трубицин И.В. | 23, 48 |
| Стрелецкий Р.А. | 30 | Трубицина Л.И. | 23, 48 |
| Стрелкова М.А. | 91 | Трубицина Н.П. | 110, 114 |
| Строкина В.В. | 356 | Трчунян К.А. | 277 |
| Струшкевич Н.В. | 70 | Тулаева Е.Р. | 338 |
| Сульдина Е.В. | 45, 50 | Тутукина М.Н. | 21 |
| Сумин Д.С. | 274 | Тымченко С.Л. | 185 |
| Супрун И.В. | 293 | Тюленев А.В. | 10, 18, 47 |
| Суханова К.В. | 110 | Тюлькова Е.И. | 334 |
| Суханова Ю.С. | 335 | Тюшкевич А.А. | 273 |
| Сухачёва О.А. | 153 | | |
| Сухер М.М. | 28, 46 | У | |
| Сущенко А.С. | 47 | Угрюмов М.В. | 294, 297, 337 |
| Т | | Уколова П.А. | 323, 330, 339 |
| Тагунов П.А. | 305 | Украинская В.М. | 337 |
| Таран А.С. | 239 | Усачева А.М. | 226 |
| Тараскин И.А. | 92 | Успенко Н.И. | 241 |
| Тарасов О.В. | 110 | Успенский В.Е. | 295, 307 |
| | | Ушакова В.М. | 287 |



Ф

| | |
|-------------------|----------|
| Фадеев А.В. | 20 |
| Фадеев П.Ю. | 95 |
| Фадеев Р.С. | 134, 223 |
| Фадеева И.С. | 311 |
| Фаттахова А.Н. | 84 |
| Федоров А.Ю. | 75 |
| Федорова А.А. | 340 |
| Федорович А.А. | 313 |
| Федорчук Т.П. | 364 |
| Федотова А.Ю. | 329 |
| Федотова Т.А. | 45 |
| Феоктистова Н.А. | 45, 49 |
| Феофилактова Т.О. | 242 |
| Филатов В.А. | 243 |
| Филатов Н.А. | 273 |
| Филиппов А.А. | 307 |
| Фирсов А.П. | 253 |
| Фирстова В.В. | 14 |
| Фокина Е.А. | 244 |
| Фомичёв И.А. | 218, 245 |
| Фрейнд С.А. | 246 |

Х

| | |
|-------------------|---------------|
| Хаблюк В.В. | 275 |
| Хайсанова В.С. | 49 |
| Хантемирова Е.В. | 99 |
| Харечкина Е.С. | 247 |
| Хартманн Р.К. | 157 |
| Харченко В.А. | 173 |
| Хацко С.Л. | 351 |
| Хегай А.А. | 278 |
| Хижина А.А. | 92, 128 |
| Хлебалина Н.А. | 50 |
| Хлопков А.Д. | 353 |
| Хмиль Н.В. | 241 |
| Холмухамедов Э.Л. | 134 |
| Холод Н.С. | 28, 46 |
| Хорина Н.А. | 9 |
| Хорн П.А. | 57, 60, 79 |
| Хоткина Н.А. | 341 |
| Хренов М.О. | 230 |
| Худокормов А.А. | 8, 35, 44 |
| Худякова А.Ю. | 356 |
| Хусаинов Г.А. | 78 |
| Хусаинова А.Р. | 200, 270, 363 |
| Хухарева Д.Д. | 346 |

Ц

| | |
|----------------|-----|
| Цветкова Н.В. | 359 |
| Цыбденова А.П. | 240 |

Ч

| | |
|---------------------|---------------|
| Чапров К.Д. | 315, 330, 335 |
| Чебыкин Ю.С. | 181 |
| Челнакова У.Е. | 212 |
| Чемезова А.А. | 158 |
| Чепель В.И. | 362 |
| Червочкина А.С. | 51 |
| Черезов В.Г. | 78, 153 |
| Черкашин А.П. | 94, 95 |
| Черников А.В. | 226 |
| Чернов Ю.О. | 121, 149 |
| Черноморец И.Ю. | 304 |
| Черных А.М. | 170, 179 |
| Чернышев К.А. | 342 |
| Чернышов Н.А. | 343 |
| Чернышов С.В. | 175, 180 |
| Четверкина А.А. | 365 |
| Чугреев М.Ю. | 202 |
| Чукавин Н.Н. | 248 |
| Чумаков А.А. | 186 |
| Чупров-Неточин Р.Н. | 108 |
| Чупрынин Г.П. | 327 |
| Чурина Т.С. | 146, 159 |

Ш

| | |
|-------------------|----------|
| Шадрина А.А. | 344 |
| Шайхутдинова З.М. | 182 |
| Шакиров Е.В. | 151 |
| Шамбазова Д.Н. | 182 |
| Шарипова М.Р. | 113, 151 |
| Шаталин Ю.В. | 181 |
| Шаталов И.С. | 250 |
| Шатилина Ж.М. | 190, 203 |
| Шатрова А.А. | 21 |
| Шатрова А.Н. | 142 |
| Шафеи Е.В. | 345 |
| Шашкина С.С. | 199, 233 |
| Шварц А.П. | 348 |
| Шварцев А.А. | 52 |
| Швед Н.А. | 252 |
| Швецова А.А. | 346, 347 |
| Швядас В.К. | 72 |
| Шевцова Ю.А. | 279 |
| Шевченко П.Г. | 213 |



| | | | |
|-------------------|---------------|---------------------|----------|
| Шедл П. | 140 | Э | |
| Шелковникова В.Н. | 53 | Эльдиб А.А. | 154 |
| Шемякин Г.М. | 160 | Эргашева М.М. | 78 |
| Шестакова В.А. | 280 | Ю | |
| Шестерикова Е.М. | 361 | Юденко А. | 65 |
| Шестопалова Л.Б. | 328 | Юдин Д.А. | 250 |
| Шехтман С.П. | 161 | Юдина Н.Ю. | 193, 206 |
| Шибяев М.И. | 306 | Юрина Л.В. | 165 |
| Шидловский Ю.В. | 98, 140 | Юршенас Д.А. | 210 |
| Шилкин Е.С. | 108, 125, 269 | Юсупов С.Р. | 201 |
| Шилов С.В. | 281 | Юценко И.П. | 351 |
| Шилягина Н.Ю. | 81, 89 | Я | |
| Широков Е.А. | 348 | Якимович С.В. | 285 |
| Широкова Ю.А. | 203 | Яковлева Е.Е. | 237 |
| Шишацкая Е.И. | 220 | Яковлева Т.В. | 162 |
| Шишкова А.А. | 307 | Якунина М.В. | 7, 33 |
| Шишкова Е.А. | 349 | Якупова Э.И. | 338 |
| Шляпников Ю.М. | 261, 282 | Якушева Е.Н. | 164 |
| Шляпникова Е.А. | 261, 282 | Якушкина Ю.В. | 183 |
| Шмарова А.А. | 283 | Ялалова И.Р. | 168 |
| Шмелев М.Е. | 109 | Яремко А.Б. | 54 |
| Шнейдер Ю.А. | 9, 38 | Яровой Б.Ф. | 249 |
| Шоева О.Ю. | 137 | Ястребова О.В. | 37 |
| Шпаков А.О. | 215, 238, 244 | Ячкула А.А. | 34 |
| Штиль А.А. | 117 | А | |
| Штыкалова С.В. | 246 | Aponte-Collazo L.J. | 134 |
| Шуберт Р. | 347 | F | |
| Шубина В.С. | 181 | Fennel E.M.J. | 134 |
| Шубина С.С. | 275 | G | |
| Шувалов А.В. | 114, 162 | Graves L.M. | 134 |
| Шувалова Е.Ю. | 114, 162 | | |
| Шукшина А.К. | 365, 366 | | |
| Шуленина О.В. | 249 | | |
| Шумаев К.Б. | 66 | | |
| Шумкова В.В. | 332, 350 | | |
| Шуплецов В.В. | 284 | | |
| Шургин В.А. | 363 | | |
| Щ | | | |
| Щепкин Д.В. | 296, 309 | | |
| Щербатюк Т.Г. | 61, 217 | | |
| Щеховский Е.А. | 204 | | |
| Щипанова Е.А. | 205 | | |
| Щулькин А.В. | 164, 236 | | |

Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук»
Институт теоретической и экспериментальной биофизики
Российской академии наук
Институт белка Российской академии наук

Научное издание

Сборник тезисов

25-ой Пушкинской школы-конференции молодых ученых с международным
участием

«БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА».

Материалы изданы в авторской редакции

Подписано в печать 15.04.2022. Формат 60x84/8
Усл. печ. л. 43,77

ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2022

ISBN 978-5-91874-907-4